



ESCOLA SUPERIOR DE SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO EM BIOLOGIA MOLECULAR EM SAÚDE

**ESTUDO DO PAPEL DA CATANINA, NA REMODELAÇÃO DO
CITOESQUELETO DE MICROTÚBULOS, DURANTE A INVASÃO E A
REPLICAÇÃO DO PARASITA *TOXOPLASMA GONDII***

Tese de dissertação
para obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular em Saúde

Andreia Filipa Dâmaso Simões

Trabalho orientado por
Professora Doutora Sofia Nolasco

Setembro de 2013



ESCOLA SUPERIOR DE SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO EM BIOLOGIA MOLECULAR EM SAÚDE

**ESTUDO DO PAPEL DA CATANINA, NA REMODELAÇÃO DO
CITOESQUELETO DE MICROTÚBULOS, DURANTE A INVASÃO E A
REPLICAÇÃO DO PARASITA *TOXOPLASMA GONDII***

Tese de dissertação
para obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular em Saúde

Andreia Filipa Dâmaso Simões

Trabalho orientado por
Professora Doutora Sofia Nolasco

Setembro de 2013

Resumo

O *Toxoplasma gondii* (*T.gondii*) é um parasita intracelular protozoário pertencente ao filo Apicomplexa, é responsável pela toxoplasmose, a causa mais comum de deficiências neurológicas congênitas em humanos. Deste filo fazem parte membros como o *Plasmodium falciparum* o agente etiológico da malária em humanos, *Besnoitia babesia* e *Theileria*, parasitas que invadem animais de quinta como o gado. Os mecanismos de invasão deste protozoário ainda não estão bem esclarecidos, sabendo-se que o seu citoesqueleto desempenha um papel importante durante a sua invasão na célula hospedeira. Os mecanismos moleculares adjacentes ao processo de invasão das células hospedeiras parecem ser conservados entre os parasitas deste filo. Os microtúbulos são os principais constituintes do citoesqueleto celular. São regulados por três tipos de proteínas: as estabilizadoras, as motoras e as desestabilizadoras. A proteína em estudo é uma proteína desestabilizadora dos microtúbulos, a catanina (subunidade catalítica p60). A catanina atua nos microtúbulos de uma forma específica, exercendo a sua função preferencialmente em microtúbulos com modificações pós-traducionais (PTMs), impedindo que estas se acumulem nos microtúbulos, como é o caso da glutamilação e da acetilação da tubulina. Os microtúbulos constituintes do citoesqueleto do protozoário em estudo são ricos em PTMs e estas parecem estar relacionadas com a grande estabilidade destas estruturas. Uma vez que estes microtúbulos altamente modificados são remodelados durante o processo de invasão por *T. gondii*, propomos estudar o papel da catanina durante este processo. Desta forma, clonámos o cDNA da catanina em fusão com a proteína GFP e com um domínio desestabilizador que permite controlar os níveis de expressão dentro da célula. Essa construção foi inserida dentro de *T. gondii* por eletroporação, com o objetivo de avaliar o efeito da sobre-expressão da catanina. A construção de DNA foi integrada com sucesso no genoma de *T. gondii* e a proteína de fusão foi produzida. Apesar de ainda ser necessário analisar se esta proteína apresenta o tamanho correto e se está funcional, numa primeira abordagem, os parasitas a sobre-expressar a catanina foram capazes de invadir a célula hospedeira e não se observou danos nos microtúbulos glutamilados. De qualquer forma, estes resultados são preliminares e ainda é necessário prosseguir com a caracterização da função da catanina de *T. gondii*.

Palavras-chave: Toxoplasma gondii, catanina, invasão, modificações pós-traducionais.

Abstract

Toxoplasma gondii (*T.gondii*) is an intracellular protozoan parasite belonging in the phylum Apicomplexa, is responsible for toxoplasmosis, the most common cause of congenital neurological defects in humans. This phylum part *Plasmodium falciparum* members as the etiologic agent of malaria in humans, *Besnoitia* *Babesia* and *Theileria* parasites that invade farm animals such as cattle. The mechanisms of invasion of this parasite are not well understood, knowing that their cytoskeleton plays an important role during their invasion into the host cell. The molecular mechanisms surrounding the process of invasion of the host cells seem to be conserved between the parasites of this phylum. Microtubules are the main constituents of the cytoskeleton consisting of tubulin dimers. Microtubules are regulated by three types of proteins: stabilizing, motor, and destabilizing. The protein under study is a microtubule destabilizing protein, the catanin (p60 catalytic subunit). Catanin acts on specific microtubules, preferring microtubules with post-translational modifications (PTMs), as the case of glutamylated and acetylated tubulin. The subpellicular microtubules of *T. gondii* present a high level of tubulin PTMs that seem to be related with the high stability of these structures. Once these highly stable microtubules are remodeled during the *T. gondii* invasion we propose to study the catanin role in this process. So, we cloned the catanin cDNA in fusion with GFP protein and with a destabilization domain that allow the control of protein levels inside the cell. We transfected this construct in *T. gondii* by electroporation to overexpress this fusion protein. The DNA construct was integrated with success in the *T. gondii* genome and the recombinant protein was produced. Although we need to check if the protein produced has the correct size and if it is functional, our preliminary results showed that parasites overexpressing catanin were able to invade host cells and we did not observe any phenotype on glutamylated microtubules. These results are preliminary and we need to continue the characterization of the catanin role in *T. gondii*.

Keywords: Toxoplasma gondii, katanin, invasion, post-translational modifications.

ÍNDICE GERAL

1	INTRODUÇÃO	9
1.1	CITOESQUELETO	9
1.1.1	FILAMENTOS DE ACTINA.....	9
1.1.2	FILAMENTOS INTERMÉDIOS	10
1.1.3	MICROTÚBULOS	10
1.1.4	DINÂMICA DOS MICROTÚBULOS	11
1.2	CATANINA.....	14
1.3	<i>Toxoplasma gondii</i>	15
1.4	OBJECTIVO	18
2	MATERIAIS E MÉTODOS	20
2.1	CLONAGEM MOLECULAR	20
2.2	VECTORES DE CLONAGEM	21
2.2.1	PLASMÍDEOS	21
2.3	SUB-CLONAGEM VETOR pGEM-T-EASY	22
2.4	SUB-CLONAGEM VETOR pIC113.....	23
2.5	CLONAGEM VETOR V 11	24
2.6	cDNA DA CATANINA.....	25
2.7	“POLIMERASE CHAIN REACTION (PCR) ”	25
2.8	ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE.....	26
2.9	PURIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE DNA	27
2.10	QUANTIFICAÇÃO DO DNA.....	27
2.11	HIDRÓLISES DE DNA.....	27
2.12	DESFOSFORILAÇÃO	28
2.13	MISTURA DE LIGAÇÃO.....	28
2.14	TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS COMPETENTES	29
2.15	“COLONY PCR “	30
2.16	PREPARAÇÃO DE DNA PLASMÍDICO EM PEQUENA ESCALA (MINIPREPS).....	32
2.17	PREPARAÇÃO DE DNA PLASMÍDICO EM GRANDE ESCALA (MAXIPREPS)	32
2.18	SEQUENCIAÇÃO	32
2.19	CONDIÇÕES E MEIOS DE CULTURA PARA BACTÉRIAS	34

2.20	<i>Toxoplasma gondii</i>	34
2.21	CULTURA DE CÉLULAS DE MAMÍFERO	35
2.22	CULTIVO DE <i>T. gondii</i> EM CÉLULAS HFF	35
2.23	ELETROPORAÇÃO DE <i>T. gondii</i>	36
2.24	SELEÇÃO DOS TRANSGÊNICOS	37
2.25	SELEÇÃO CLONAL	38
2.26	MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA	38
3	RESULTADOS	39
3.1	CLONAGEM MOLECULAR	39
3.1.1	SUB-CLONAGEM DA CATANINA DE <i>Toxoplasma gondii</i> EM pGEM-T-EASY	39
3.1.2	HIDRÓLISE DO VETOR pGEM-T-EASY COM O cDNA DA CATANINA CLONADO	40
3.1.3	SUB-CLONAGEM DA CATANINA DE <i>Toxoplasma gondii</i> NO VECTOR pIC 113	41
3.1.4	SEQUENCIAÇÃO DA CATANINA NO VECTOR pIC 113	42
3.1.5	CLONAGEM DA REGIÃO CODIFICANTE DA CATANINA DE <i>Toxoplasma gondii</i> EM FUSÃO COM A GFP NO VECTOR V11	43
3.2	TRANFEÇÃO, POR ELETROPORAÇÃO, DOS <i>Toxoplasma gondii</i>	48
4	DISCUSSÃO	50
5	CONCLUSÃO	54
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

Ilustração 1 Estrutura do heterodímero da tubulina. Verifica-se a localização do GTP/GDP nos monómeros de α - tubulina e β -tubulina ; o GTP como mostra a figura está ligado à α -tubulina e o GDP à β -tubulina. Adaptado de: Lodish. et al.,2000.....	12
Ilustração 2 <i>Toxoplasma gondii</i> A- <i>T.gondii</i> e as estruturas envolvidas no processo de invasão da célula hospedeira. Adaptado de: Soldati & Meissner, 2004; B- Ciclo intracelular do <i>T. gondii</i> . O <i>T. gondii</i> desliza pela superfície celular utilizando um sistema motilidade chamado “gliding” e adere à membrana celular penetrando ativamente a célula hospedeira (“gliding & adesión”). A adesão ocorre através de proteínas secretadas por si através do complexo apical. À medida que ocorre a invasão o <i>T. gondii</i> e a membrana celular da célula hospedeira sofrem constrição de modo a que o <i>T. gondii</i> seja invaginado para dentro da célula hospedeira. Após a invasão o <i>T. gondii</i> forma um vacúolo, denominado de vacúolo parasitófago, que o protege e permite que se replique (“Replication / Cyst Development”) dentro da célula. Por fim, a célula é lisada para que haja libertação dos novos parasitas (“Egress”). Adaptado de: Billker O,et al., 2009	17
Ilustração 3 1. ^a FASE, ligação do vetor com o fragmento para formar uma molécula de DNA recombinante.	20
Ilustração 4 2. ^a FASE, transformação de bactérias competentes com uma molécula de DNA recombinante.	20
Ilustração 5 Vetor de Clonagem pGEM-T-Easy, destaque de locais de ligação a T (timina), e o gene que confere resistência ao antibiótico.....	22
Ilustração 6 Mapa do vetor pIC 113, destaque do gene que confere resistência ao antibiótico deste vetor.	23
Ilustração 7 Mapa do vetor V11, destaque do gene que confere resistência ao antibiótico, para o gene de seleção do <i>T. gondii</i> transformados e a para o domínio dd.	24
Ilustração 8 Câmara de Neubauer	36
Ilustração 9 Resultado da eletroforese em gel de agarose a 1% do "colony PCR" correspondente sub-clonagem do cDNA da catanina de <i>T.gondii</i> no vetor de clonagem pGEM-T-EASY; M-Marcador de massa molecular; 1-10 colónias selecionadas para ensaio de "colony PCR"; CP-controlo positivo; CN- controlo negativo.....	39
Ilustração 10 Eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos da hidrólise do vetor recombinante pGEM-T-EASY; M-marcador de massa molecular; 1-2 produtos de hidrólise das colónias selecionadas (4 e 6) por “colony PCR”.	40
Ilustração 11 Eletroforese em gel de agarose a 1% da sub-clonagem da região codificante da catanina de <i>T.gondii</i> no vetor de clonagem pIC 113; M-Marcador de massa molecular; 1-10 colónias selecionadas para “Colony PCR”; CP-controlo positivo; CN-controlo negativo;	41
Ilustração 12 Electroforese em gel de agarose a 1% referente à hidrólise do vetor pIC 113 com a região da catanina clonada; M- marcador de massa molecular; 1-2	

produto de hidrólise das colónias seleccionadas (9 e 10) pelo “colony PCR” com 1761pb (este fragmento contém parte da região codificante da catanina e parte da região codificante da GFP).	42
Ilustração 13 Eletroforese em gel de agarose a 1% do PCR da catanina em fusão com a GFP a partir do vetor pIC 113. Fig. A -sem produto de amplificação; Fig. B- locais de extração da banda de DNA com tamanho aproximado de 1979pb.	44
Ilustração 14 Eletroforese em gel de agarose a 1% do PCR da catanina em fusão com a GFP a partir do vetor pIC 113 com locais de extração da banda de DNA com tamanho aproximado de 1979pb.....	45
Ilustração 15 Electroforese em gel de agarose a 1% referente ao PCR com gradiente de temperaturas de 40°C a 60,6°C. A-Gradiente de temperaturas referente ao DNA plasmídico extraído da colónia 9; B – Gradiente de temperaturas referente ao DNA plasmídico extraído da colónia 10; C- Controlo negativo do gradiente de temperaturas;.....	46
Ilustração 16 Análise dos resultados do PCR da catanina no vetor pIC113 por eletroforese em gel de agarose a 1%, utilizando os “primers internos” da catanina. 47	
Ilustração 17 Imunofluorescência indirecta dos transgénicos de <i>T.gondii</i> (sobre-expressão da catanina-GFP) 30 minutos após invasão, na presença de “shield”, os transgénicos de sobre-espressão e os controlo (<i>T.gondii</i> “wild-type”) Fig. A e B – expressão da catanina em fusão com a GFP (verde) a tubulina glutamilada (vermelho), o DNA (azul) e a sobreposição das imagens (merge); Fig.B-Observe-se que por vezes a proteína de fusão surge mais localizada em pequenos pontos que poderão corresponder aos centróssomas (verde), o núcleo (azul), tubulina glutamilada (vermelho); Fig.C – Painel controlo, onde podemos observar a marcação da tubulina glutamilada no controlo (vermelho) e núcleo (azul).S. Barra de escala = 5µm.	49

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 “Primers” utilizados nas reações de PCR, com os vetores: T-easy; pIC 113 e V11.....	26
Tabela 2 Tabela com as enzimas de restrição utilizadas em cada clonagem, locais de restrição verificados em: https://www.neb.com/tools-and-resources/selection-charts/frequencies-of-restriction-sites	28
Tabela 3 Condições do “Colony PCR” para amplificação da catanina, nos vetores de clonagem pGEM-T-EASY e pIC 113.....	31
Tabela 4 Condições de “Colony PCR” para amplificação da catanina, no vector V11	31
Tabela 5 Condições de PCR e reagentes utilizados.	33
Tabela 6 Primers utilizados nas reações de sequenciação	33

ABREVIATURAS

cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
<i>ADP</i>	<i>Adenosina Difosfato</i>
<i>ATP</i>	<i>Adenosina Trifosfato</i>
C	Celsius
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleótido Trifosfato
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
GDP	Guanosina Difosfato
GTP	Guanosina Trifosfato
Kb	Kilobase
ml	Mililitros
mM	Milimolar
Ng	Nanogramas
<i>nm</i>	<i>Nanómetros</i>
p/v	Concentração peso por volume
pb	Pares de base
pmol	Picomolar
TAE	Solução de Tris-Acetato e EDTA
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
Tris	Tris(hidroximetil) aminometano
U	Unidade
V	Volume
v/v	Concentração volume por volume
xg	Guages
μl	Microlitros

1 INTRODUÇÃO

1.1 CITOESQUELETO

As células eucariotas são constituídas por uma rede complexa de fibras proteicas que formam o citoesqueleto. O citoesqueleto celular está localizado no interior da célula, no seu citoplasma (Yue, et al., 2013).

Existem inúmeras funções celulares nas quais o citoesqueleto está envolvido devido a um conjunto de proteínas e polímeros que estão em constante dinâmica. Alguns exemplos das funções do citoesqueleto são: a manutenção da forma celular, a locomoção, a dinâmica estrutural, o transporte intracelular e a divisão celular (Mullins & Fletcher, 2010).

O citoesqueleto celular é composto por três tipos de filamentos, os filamentos de actina ou microfilamentos, filamentos intermédios e filamentos de microtúbulos (MTs).

1.1.1 FILAMENTOS DE ACTINA

Os filamentos de actina são constituídos por monómeros de actina. Para além da actina existem outras proteínas que interagem com estes filamentos e que contribuem para a maioria das suas funções celulares, como é o caso dos movimentos de superfície, da manutenção da forma, fagocitose, comunicação intracelular e distribuição de organelos. As proteínas que interagem com os filamentos de actina são proteínas que fazem a ligação de uns filamentos de actina aos outros e que permitem a formação de uma “rede” estrutural dentro da célula, o córtex celular (Standring, 2010).

A actina existe sob duas formas distintas, na forma monomérica (G-actina ou actina globular) e na forma de polímeros (F-actina ou actina filamentosa). Os filamentos de actina oscilam entre o estado monomérico e o estado de polímeros (Dominguez., 2009).

1.1.2 FILAMENTOS INTERMÉDIOS

Como descrito anteriormente, os filamentos intermédios (IFs, de “intermediate filaments”) são uns dos principais constituintes do citoesqueleto celular. Estes são chamados de IFs, porque o seu diâmetro de 10 nm está compreendido entre o diâmetro dos filamentos de actina (6-8 nm) e o diâmetro dos MTs (20-25 nm) (Machado & Figueiredo, 1996).

Estes filamentos são constituídos por dois polipéptidos que se enrolam em torno de si próprios, formando dímeros. Os dímeros vão então associar-se de forma anti-paralela para formar tetrâmeros. A montagem dos IFs implica a formação e junção de oito tetrâmeros, que formam os protofilamentos (Cooper, 2000).

Funcionalmente os IFs caracterizam-se por serem os principais responsáveis pela manutenção da forma e da integridade celular (Kim & Coulumbe, 2007).

1.1.3 MICROTÚBULOS

Os MTs são um dos principais constituintes do citoesqueleto celular e também um dos principais elementos de estudo desta tese. Estes polímeros são compostos por dímeros da proteína tubulina. O monómero de tubulina existe sob três formas principais: a α -tubulina, a β -tubulina e a γ -tubulina, sendo que apenas as duas primeiras fazem parte da constituição dos MTs.

Sendo dos principais constituintes celulares os MTs são muito importantes na célula, desempenhando funções ao nível da divisão celular, manutenção da forma, assimetria celular, organização citoplasmática, intervêm em algumas formas de motilidade celular (Desai & Hyman, 1999), transporte intracelular de organelos e separação dos cromossomas durante a mitose em interfase (Cooper, 2000).

1.1.4 DINÂMICA DOS MICROTÚBULOS

Os MTs são estruturas dinâmicas e são constituídos por dímeros de tubulina, mais propriamente de α -tubulina e de β -tubulina, estas associam-se “topo a topo” formando protofilamentos. Os dímeros de tubulina polimerizam para formar os MTs, os quais consistem em treze protofilamentos lineares montados em forma de cilindro oco dispostos em paralelo. Consequentemente, os MTs são estruturas polares com duas extremidades distintas, uma de crescimento rápido e outra de crescimento lento. Esta polaridade é importante na determinação da direção do movimento ao longo dos MTs (Cooper, 2000).

A cada molécula de α e β -tubulina liga-se uma molécula de GTP. No dímero de tubulina o GTP da α -tubulina encontra-se na região intra-dímero e não é hidrolisável, já o GTP da β -tubulina encontra-se na extremidade do dímero e pode ser hidrolisado, passando de GTP a GDP. Sendo assim, os MTs apresentam duas extremidades: a negativa (extremidade onde se encontra a α -tubulina) e a positiva (extremidade onde se encontra a β -tubulina). A extremidade negativa não apresenta nenhuma molécula de GTP hidrolisável e a extremidade positiva (de β -tubulina) apresenta uma molécula de GTP que pode ser hidrolisada passando a GDP, à medida que vão sendo adicionado os dímeros de tubulina, topo a topo, vai ocorrendo a hidrólise do GTP da β -tubulina. A hidrólise do GTP para GDP diminui a afinidade da tubulina para se ligar a outras moléculas proteicas, favorecendo a despolimerização (Lodish, et al., 2000).

Os MTs apresentam dois tipos de comportamentos dinâmicos: a) o treadmilling, no qual as moléculas de tubulina ligadas ao GDP vão sendo desprezadas na extremidade negativa dos MTs e substituídas pela adição de dímeros de tubulina ligados a GTP na extremidade positiva dos mesmos; b) a instabilidade dinâmica, a velocidade a que ocorre a hidrólise do GTP versus a adição de novos dímeros resulta neste tipo de comportamento dinâmico que é caracterizado por fases de crescimento rápido e de encurtamento dos MTs. Neste último caso, os dímeros de tubulina são adicionados com maior rapidez do que o GTP é hidrolisado, promovendo o crescimento dos MTs, no entanto, quando a taxa de GTP hidrolisado em GDP ocorre mais rapidamente do que são adicionados nucleótidos de tubulina

ocorre dissociação dos nucleótidos de tubulina GDP resultando numa rápida despolimerização dos MTs (Lodish, et al., 2000).

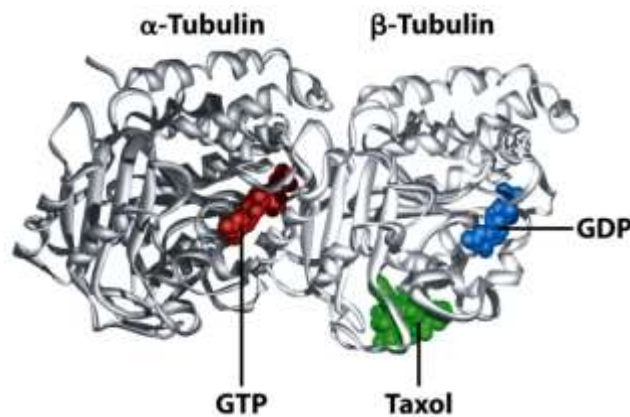


Ilustração 1 Estrutura do heterodímero da tubulina. Verifica-se a localização do GTP/GDP nos monómeros de α - tubulina e β -tubulina ; o GTP como mostra a figura está ligado à α -tubulina e o GDP à β -tubulina. Adaptado de: Lodish. et al.,2000

1.1.4.1 REGULAÇÃO DA DINÂMICA DOS MICROTÚBULOS

A dinâmica intrínseca dos MTs está em constante modificação, facto que se deve a interações com diferentes fatores celulares, tais como as proteínas que impedem a sua desmontagem interagindo com os dímeros de tubulina (Copper, 2000).

As proteínas que interagem com os MTs são distinguidas como: estabilizadoras dos MTs, proteínas motoras e proteínas destabilizadoras dos MTs. As proteínas associadas aos MTs, MAPs (“microtubule associated proteins”), podem ser distinguidas em dois grupos: as proteínas que estão diretamente ligadas a funções motoras e as proteínas que estão envolvidas nas funções estruturais.

1.1.4.1.1 PROTEÍNAS ASSOCIADAS AOS MICROTÚBULOS E PROTEÍNAS MOTORAS

As MAPs estruturais são proteínas que se associam às extremidades positivas do MTs regulando a instabilidade dinâmica destes, assim como, as interações com outras estruturas celulares. Estas formam “pontes” que se localizam transversalmente entre os MTs adjacentes ou entre os MTs e os filamentos intermédios, mitocôndrias ou membrana plasmática. Estas estão relacionadas com as funções de manutenção, formação e despolimerização dos MTs, sendo por isso de extrema importância na morfogênese celular, divisão mitótica, manutenção e modulação da forma celular (Standring,2010).

As MAPs motoras são as que estão associadas à motilidade celular, movem-se ao longo dos MTs utilizando a energia proveniente da hidrólise do ATP. As proteínas motoras intervêm em funções como o transporte de vesículas citoplasmáticas, encurvamento de cílios e flagelos e alguns movimentos do fuso mitótico (Standring,2010; Mandelkow & Mandelkow, 1995).

1.1.4.1.2 PROTEÍNAS ESTABILIZADORAS DOS MICROTÚBULOS

As MAPs são proteínas que se ligam aos MTs e que regulam a estabilidade dos mesmos. Permitem a regulação da polimerização, despolimerização e determinam a progressão do ciclo celular (Baquero, et al., 2011). As MAPs estabilizadoras ligam-se e co-polimerizam com os MTs ao longo de vários ciclos de montagem e desmontagem, estimulando a sua nucleação e estabilizando-os (Felgner, et al., 1997, citado por Amos & Schlieper, 2005).

1.1.4.1.3 PROTEÍNAS DESTABILIZADORAS DOS MICROTÚBULOS

As proteínas destabilizadoras dos MTs quebram ou despolimerizam os MTs. Existem várias proteínas que podem exercer este efeito sobre eles, como é o caso da catanina (Liang-Yi, et al., 2004).

A catanina, foi identificada como sendo uma proteína destabilizadora dos MTs. A sua atividade aumenta durante a prófase mitótica sugerindo ter um papel importante na desmontagem dos MTs em interfase, permitindo desta forma que a tubulina seja utilizada para a montagem do fuso mitótico (Sharma, et al., 2007).

Em *Tetrahymena*, um protozoário ciliado, a catanina reduz a massa do polímero dos MTs, assim como aumenta o nível de dinâmica do polímero no corpo celular. Na mesma célula, a catanina promove também a montagem dos MTs ciliares, considerando-se por isso que a catanina atua num determinado tipo específico de MTs (Sharma, et al., 2007).

1.2 CATANINA

A catanina, para além de ser uma proteína desestabilizadora, é uma hidrolase heterodimérica pertencente à família das proteínas AAA. Da família destas proteínas fazem parte a catanina, a MSP1, a Espastina e a Fidgetina (Ghosh, et al., 2012). A catanina é constituída por duas subunidades a p60 e a p80, sendo consideradas respetivamente como unidade catalítica e unidade não catalítica (Hartman & Vale, 1999).

A subunidade catalítica tem sido descrita em ensaios *in vivo* como organizadora dos MTs e como tendo um papel ativo na formação de pequenos MTs, destinados ao transporte de extensões neuronais.

A subunidade não catalítica é necessária à montagem do par de MTs centrais nos axonemas ciliares, regulando também a massa do polímero dos MTs que é necessária à sua montagem. Esta subunidade não tem capacidade de corte dos MTs, no entanto encontra-se ligada aos centrossomas de modo a permitir que a porção total da catanina seja redirecionada para o centrossoma favorecendo a capacidade de corte da subunidade p60 (Fridoon, et al., 1999). Para exercer a sua função, cortar e desmontar MTs, a catanina necessita de hidrolisar ATP.

Estudos realizados em axónios demonstraram que a catanina está presente no centrossoma e quando inibida impede que os MTs se libertem do centrossoma, diminuindo o comprimento dos MTs ao longo do corpo neuronal (Fridoon, et al., 1999).

Em *Drosophila* S2, a catanina provoca destabilização do cinetócoro de MTs, mais propriamente nas extremidades negativas contribuindo assim para a separação dos cromátídeos durante a anafase A (Loughlin, et al., 2011).

Ao cortar MTs a catanina também gera dinâmica. Esta proteína promove a montagem dos MTs ciliares, sendo que a sua atividade é específica não atuando ao acaso (Sharma, et al. 2007). Surge como uma proteína que intervém como um regulador em positivo regulando a massa do polímero dos MTs sendo muito importante na sua montagem. No entanto também pode promover uma regulação pela negativa, em casos de dímeros de tubulina ou de MTs curtos. A catanina atua em tipos específicos de MTs (Sharma, et al., 2007) sendo a sua atividade necessária para inibir a acumulação de modificações pós-traducionais (Verhey & Gaertig, 2007). Uma vez que o *T. gondii* apresenta MTs altamente modificados, considera-se que a catanina é uma forte candidata a regular a remodelação dos MTs que ocorre durante o processo de invasão deste parasita.

1.3 *Toxoplasma gondii*

O *T. gondii* é um dos membros do filo Apicomplexa, destacando-se neste filo parasitas como o *Plasmodium falciparum*, *Besnoitia*, *besnoiti*, entre outros. O *T.gondii* é o agente etiológico da toxoplasmose, provocando defeitos neurológicos congénitos nos humanos. A toxoplasmose é uma zoonose que afeta vários seres humanos, com maior incidência em grupos de risco como pessoas imuno-comprometidas, sendo considerado um oportunista (Mondragon, & Frixione, 1996).

A sua capacidade de sobrevivência depende da forma como invade, replica e sai da célula (Swedlow, et al., 2001). Estruturalmente no *T.gondii* distingue-se o conóide, o complexo apical e os MTs sub-películas, estruturas que o parasita utiliza para invadir a célula hospedeira (Dubey, et al., 1998). Utilizando o seu complexo apical, o *T.gondii* adere à célula hospedeira utilizando um sistema de adesão baseado na motilidade chamado de “gliding”, penetrando ativamente na célula. O processo de invasão é mediado pelo seu citoesqueleto de actina e assim como os seus mecanismos moleculares, estes parecem ser altamente modificados e actina/miosina dependentes (Reis, et al., 2006). O *T.gondii* quando invade a célula hospedeira re-estrutura os seus MTs, ocorrendo a polimerização da actina, para que o parasita penetre na célula hospedeira. Este processo é totalmente independente do citoesqueleto da célula hospedeira (Sibley, D., 2011).

O complexo apical tem um papel crucial durante a fase de invasão, este está disposto em torno do conóide que é uma estrutura extensível e retrátil e que

intervêm durante a invasão. O conóide é essencialmente composto por tubulina (Mondragon & Frixione, 1996; Hu, et al., 2002). Neste caso, polímero da tubulina encontra-se organizado de uma forma diferente em relação aos típicos MTs (Ke, et al., 2002).

Após o isolamento das estruturas do conóide e do complexo apical identificaram-se cerca de duzentas proteínas que representam cerca de setenta por cento das proteínas do citoesqueleto (Hu, et al., 2006).

Para além das evidências acima descritas, o citoesqueleto destes parasitas tem componentes característicos das células eucariotas, como MTs, actina, proteínas dos filamentos intermédios (Fayer & Frenkel, 1979; Tadros & Laarman, 1981).

Os MTs dos *T.gondii* são altamente modificados. Em comparação com a maioria dos MTs, os MTs subpeliculares são bastantes estáveis e resistentes a altas pressões, frio e detergentes utilizados no isolamento destas estruturas (Morrissette & Sibley, 2002).

As modificações pós-traducionais (PTM, de “post-translation modifications”) são mais abundantes em MTs menos dinâmicos, sugerindo que estas contribuem para a estabilidade dos MTs e intervêm na sua associação com as MAPs (Verhey & Gaertig, 2007). Desta forma, estas modificações poderão ser responsáveis pela complexidade e estabilidade dos MTs deste parasita. As PTMs ocorrem nos heterodímeros de α e de β -tubulina que formam os MTs (Plessmann, et al., 2004) e podem incluir a acetilação e a glutamilação.

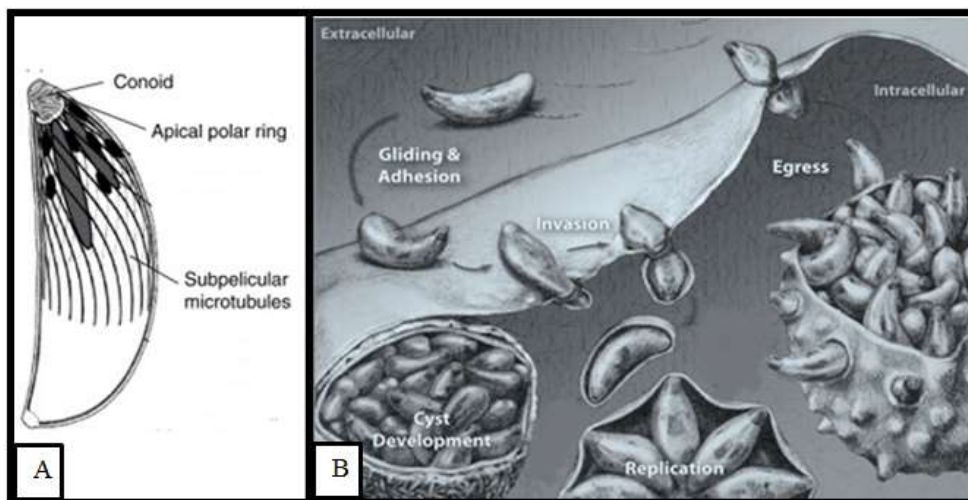


Ilustração 2 *Toxoplasma gondii* A- *T.gondii* e as estruturas envolvidas no processo de invasão da célula hospedeira. Adaptado de: Soldati & Meissner, 2004; B- Ciclo intracelular do *T. gondii*. O *T. gondii* desliza pela superfície celular utilizando um sistema motilidade chamado “gliding” e adere à membrana celular penetrando ativamente a célula hospedeira (“gliding & adesão”). A adesão ocorre através de proteínas secretadas por si através do complexo apical. À medida que ocorre a invasão o *T. gondii* e a membrana celular da célula hospedeira sofrem constrição de modo a que o *T. gondii* seja invaginado para dentro da célula hospedeira. Após a invasão o *T. gondii* forma um vacúolo, denominado de vacúolo parasitófago, que o protege e permite que se replique (“Replication / Cyst Development”) dentro da célula. Por fim, a célula é lisada para que haja libertação dos novos parasitas (“Egress”). Adaptado de: Billker O, et al., 2009

1.4 OBJETIVO

Este trabalho teve por objetivo contribuir para o estudo da invasão do *T.gondii* e do papel da catanina na regulação do citoesqueleto de MTs durante este processo.

O *T.gondii* é um parasita protozoário pertencente ao filo Apicomplexa e o agente causador da toxoplasmose que afeta humanos provocando deficiências neurológicas congênitas. Os doentes imuno-comprometidos estão entre a população humana mais afetada por esta protozoonose (Mondragon & Frixione, 1996). O ciclo de vida deste protozoário depende da forma como invade, replica e sai da célula (Swedlow, et al., 2001). Durante o processo de invasão o citoesqueleto do parasita é remodelado (Sibley, D., 2011). Este parasita utiliza estruturas específicas no processo de invasão: como o conóide, o complexo apical e MTs subpeliculares (Dubey, et al., 1998). Os MTs subpeliculares são altamente modificados (acetilados e glutamilados) e estas modificações pós-traducionais da tubulina estão envolvidas na regulação das funções dos MTs (Verhey & Gaertig, 2007). Após o isolamento das estruturas do conóide e do complexo apical identificaram-se cerca de duzentas proteínas que representam cerca de setenta por cento das proteínas do citoesqueleto (Hu, et al., 2006). A identificação das proteínas envolvidas nessa remodelação pode contribuir para uma melhor compreensão dos mecanismos de invasão (Sibley, D., 2011).

Desta forma, a proteína catanina surge como uma forte candidata a estar envolvida na remodelação dos microtúbulos durante o processo de invasão do *T. gondii*, uma vez que esta “cliva” os MTs aumentando a sua dinâmica, e por ter preferência por MTs modificados como é o caso dos MTs subpeliculares de *T.gondii*.

Neste projeto propomos estudar o gene que codifica a catanina em *T. gondii*, investigando a sua importância durante a invasão da célula hospedeira e a replicação do parasita.

Para isso, iremos clonar o gene da catanina de *T. gondii* e criar transgênicos que sobre-expressem a catanina. Serão feitos ensaios de placa para verificar se os parasitas apresentam alguma deficiência durante o seu ciclo celular (invasão, replicação e egresso). Caso seja detectado fenótipo no ensaio de placas, para tentar

localizar onde está o problema, serão feitos ensaios de invasão, de replicação e de egresso. Estes ensaios serão complementados por microscopia de fluorescência (usando anticorpos específicos para as proteínas do citoesqueleto) e técnicas de bioquímica (eletroforese de proteínas e “western-blot”).

Desta forma, esperamos contribuir para uma melhor compreensão do papel da catanina na remodelação do citoesqueleto de MTs durante a invasão e a replicação do parasita.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 CLONAGEM MOLECULAR

O conceito de clonagem molecular, baseia-se na capacidade que esta técnica nos fornece de podermos replicar várias cópias do DNA que pretendemos estudar.

Numa primeira fase inserimos o fragmento de DNA de interesse, num vetor plasmídeo. Desta forma obtém-se uma molécula de DNA recombinante. Numa segunda fase, a molécula de DNA recombinante é transportada para dentro de uma bactéria competente, que após sucessivas divisões, produz inúmeras cópias do DNA recombinante, ou seja, produz clones.

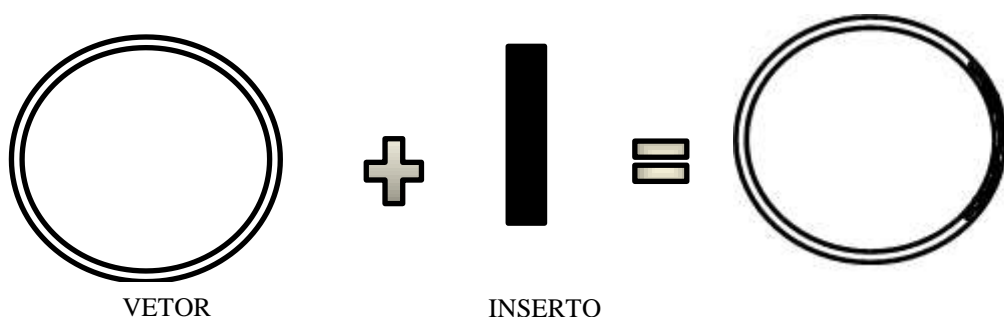


Ilustração 3 1.ª FASE, ligação do vetor com o fragmento para formar uma molécula de DNA recombinante.

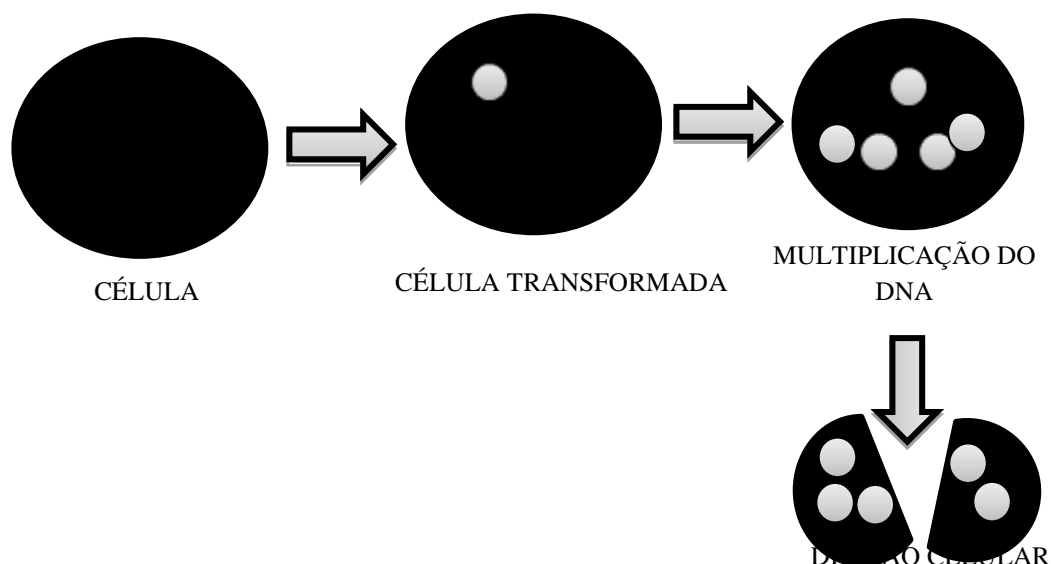


Ilustração 4 2.ª FASE, transformação de bactérias competentes com uma molécula de DNA recombinante.

2.2 VECTORES DE CLONAGEM

2.2.1 PLASMÍDEOS

Os vetores utilizados durante este trabalho de investigação foram os plasmídeos. Estes são pequenas moléculas de DNA circular de dupla cadeia que existem naturalmente em vários microrganismos, nomeadamente em bactérias e em fungos. A estirpe bacteriana utilizada foi a DH5 α de *Escherichia coli*. As bactérias DH5 α possuem o gene *lacZ*, gene da β -D-galactosidade, permitindo a seleção de colónias azuis/brancas pelo fenótipo do operão da lactose na presença de X-Gal. O seu genótipo é, F⁻ Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17* (rK⁻, mK⁺) *phoA supE44* λ^- *thi-1 gyrA96 relA1* (retirado de: www.invitrogen.com).

2.3 SUB-CLONAGEM VETOR pGEM-T-EASY

O vetor de clonagem plasmídico, pGEM-T-EASY (Promega), está linearizado e nas extremidades apresenta um nucleótido de timina desemparelhado, que permite a ligação dos produtos de PCR que tenham na extremidade um nucleótido de adenina desemparelhado (normalmente adicionado pela *Taq* polimerase, desde que esta não faça revisão de provas). O objetivo desta sub-clonagem foi o de clonar o cDNA da catanina previamente amplificado por PCR. Este vetor tem a vantagem de ser um bom intermediário para clonar produtos de PCR, amplificando moléculas de DNA em larga escala.

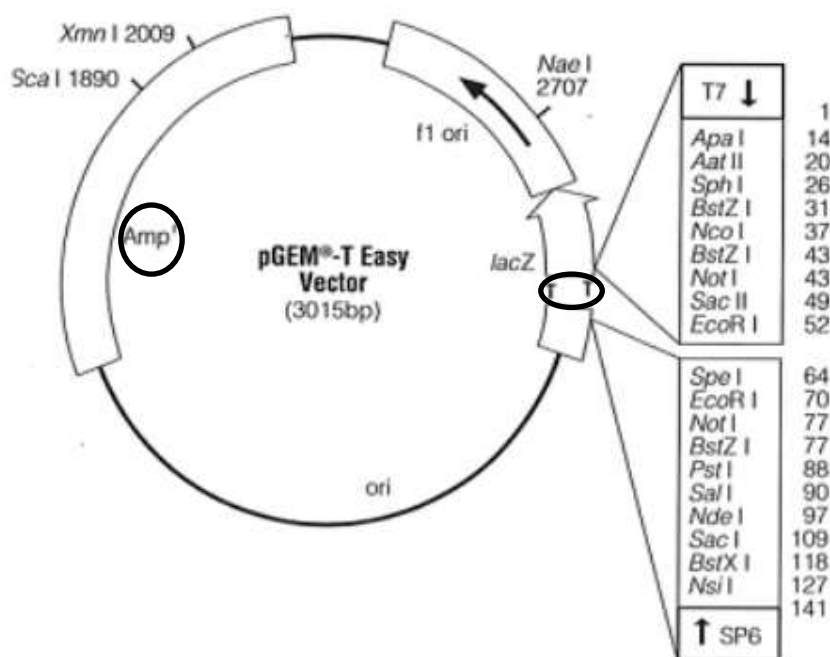


Ilustração 5 Vetor de Clonagem pGEM-T-Easy, destaque de locais de ligação a T (timina), e o gene que confere resistência ao antibiótico.

2.4 SUB-CLONAGEM VETOR pIC113

A sub-clonagem no vetor pIC113 (gentilmente cedido pelo Dr. Iain Cheeseman, Whitehead Institute for Biological Research and Department of Biology, Massachusetts Institute of Technology, Massachusetts, USA) teve como objetivo clonar o cDNA da catanina em fusão com o cDNA da GFP (“green fluorescent protein”), isto porque este vetor contém a região codificante da GFP. A partir do vetor pGEM-T-easy amplificou-se o cDNA da catanina. O produto foi clonado no vetor pIC 113 por forma a fundir o cDNA da catanina ao cDNA da proteína GFP.

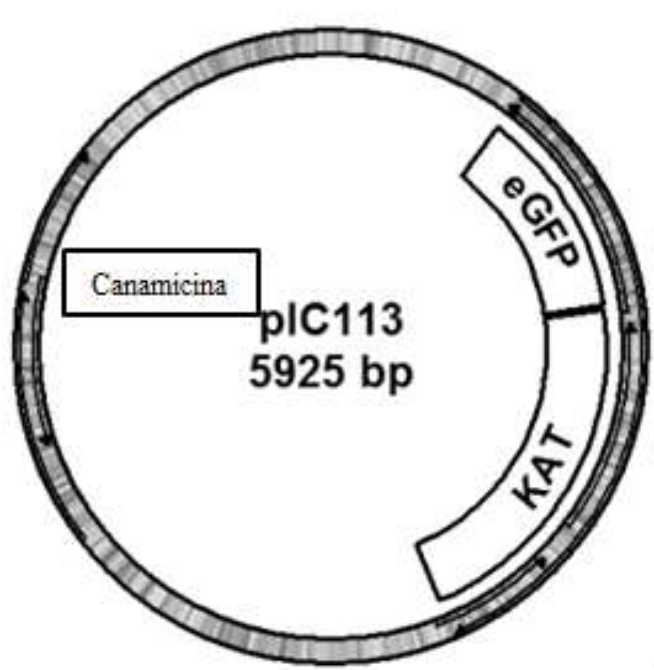


Ilustração 6 Mapa do vetor pIC 113, destaque do gene que confere resistência ao antibiótico deste vetor.

2.5 CLONAGEM VETOR V 11

O vetor de clonagem plasmídico V11 é um vetor de expressão de *T. gondii* que foi gentilmente cedido pelo Dr. Markus Meissner (Institute of Infection, Immunity and Inflammation, Wellcome Centre for Molecular Parasitology, Glasgow Biomedical Research Centre, University of Glasgow, Glasgow, United Kingdom). Este vetor contém um domínio dd, domínio desestabilizador da proteína, que faz com que a proteína produzida seja imediatamente degradada. No entanto, a adição de um “shield” neutraliza a ação do domínio dd e a proteína deixa de ser degradada tornando possível regular os níveis de proteína intracelular.

A partir do vetor pIC113 amplificou-se o cDNA da catanina em fusão com a região codificante da GFP. O produto amplificado foi clonado no vetor V11 por forma a ficar também em fusão com o domínio dd.

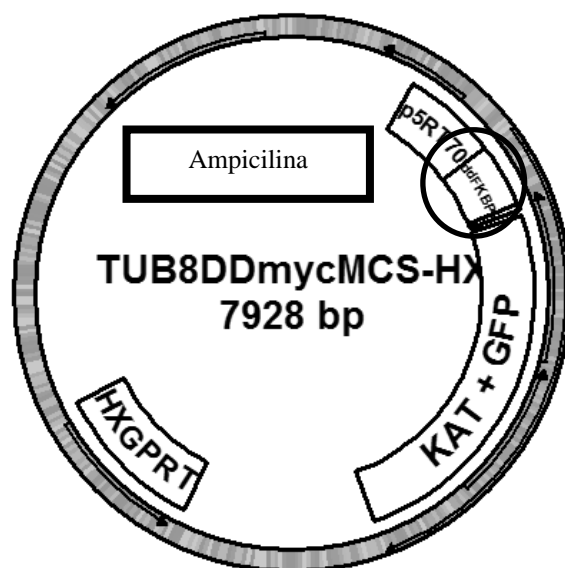


Ilustração 7 Mapa do vetor V11, destaque do gene que confere resistência ao antibiótico, para o gene de seleção do *T. gondii* transformados e a para o domínio dd.

2.6 cDNA DA CATANINA

A sequência do cDNA da catanina de *T. gondii* foi pesquisada na base de dados ToxoDB (<http://toxodb.org/toxo/>), utilizando a sequência de cDNA da catanina humana como comparação.

2.7 “POLIMERASE CHAIN REACTION (PCR)”

A técnica de PCR, tem por objetivo a amplificação de um fragmento específico de DNA. O cDNA da catanina foi amplificado por PCR a partir de uma amostra de cDNA de *T. gondii*.

As reações foram realizadas em microtubos de 200µl num termociclador eppendorf, em volumes totais de 25µl. Cada mistura continha: uma solução de desoxirribonucleótidos (dNTP's) 0,2mM, 30pmol de cada “primer” específico, MgCl₂ 1,5mM, 1U de *Dream Taq* polimerase (Fermentas) em tampão Green do fabricante a 1X, o volume total de 25µl perfeito com água estéril.

O programa utilizado no termociclador compreendia 1 ciclo de desnaturação inicial, seguido de 35 ciclos de desnaturação, “annealing” dos “primers” e extensão e por fim a um ciclo de extensão final. Cada par de “primers” apresenta uma temperatura de “annealing” distinta que está dependente da sequência intrínseca de cada “primer”. No caso da *Taq* polimerase *Phusion*, *Taq* DNA que faz revisão de provas, acrescentam-se três graus à temperatura de “annealing” da reação de PCR.

O produto de amplificação foi analisado em gel de agarose a 1% (p/v) e em seguida extraído do gel, purificado (ver 2.9) e sequenciado.

Vector	Insert	Primers	Tm°
T-easy	catanina	F- ^{5'} CCC GAGCTCCAAG AGA AAG GTG CACCATG ^{3'} R- ^{5'} CGC GGATCCTCATCGACTGCCGAACTC ^{3'}	56°C
pIC113	catanina + GFP	F- ^{5'} CCC GAGCTCCAAG AGA AAG GTG CACCATG ^{3'} R- ^{5'} CGC GGATCCTCATCGACTGCCGAACTC ^{3'}	56°C
V11	catanina + GFP + Domínio dd	F- ^{5'} GAATGCGGCCGCGTGAGCAAGGGCGAGGAG ^{3'} R- ^{5'} CCCTTAATTAATCATCGACTGCCGAACTCG ^{3'}	60°C

Tabela 1 “Primers” utilizados nas reações de PCR, com os vetores: T-easy; pIC 113 e V11.

2.8 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Os produtos de amplificação obtidos a partir do PCR ou hidrólise, foram analisados em gel de agarose com uma concentração de 1% (p/v), em TAE (Tris 40 mM, EDTA 1 mM pH 8,3) a 1X, aplicando-se uma voltagem de cerca de 100V.

O DNA analisado por eletroforese foi corado com Green Safe (NZYtech). Este foi adicionado ao tampão de eletroforese TAE 1X na proporção de 1:100 v/v, permitindo a posterior visualização do DNA num transiluminador com radiação ultravioleta.

As amostras de DNA, a aplicar no gel, continham tampão de amostra Green a 1X (Fermentas).

A massa molecular dos fragmentos de DNA foi estimada por comparação direta com o marcador de massas moleculares de DNA conhecido, O'gene Ruler 1 kb DNA ladder (Fermentas).

2.9 PURIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE DNA

Os fragmentos de DNA obtidos a partir de eletroforese em gel de agarose foram excisados e o seu DNA extraído com recurso ao QIAquick gel extraction kit da QUIAGEN, de acordo com as especificações do fabricante.

2.10 QUANTIFICAÇÃO DO DNA

Após a purificação dos fragmentos de DNA a quantificação do DNA foi realizada no equipamento Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). Este equipamento utiliza o método de espectrofotometria sob radiação ultravioleta a 260nm de comprimento de onda.

2.11 HIDRÓLISES DE DNA

A hidrólise de DNA ocorre com recurso a enzimas de restrição. Estas são endonucleases de restrição isoladas a partir de procariotas, fungos e algas. Estas endonucleases reconhecem sequências específicas de DNA em cadeia dupla. As enzimas de restrição do tipo II são as mais utilizadas em engenharia genética. Estas atuam dentro ou muito perto das sequências específicas que elas próprias reconhecem. Estas sequências são compostas por quatro ou seis de nucleótidos e possuem um eixo de simetria, denominadas por sequências palindrómicas.

As reações de hidrólise dos vetores pelas respetivas enzimas de restrição utilizadas na clonagem, decorreram durante 16 horas a 37°C, em volumes finais de 50µl. As hidrólises foram efetuadas de acordo com as recomendações do fabricante, e de cada amostra de DNA hidrolizou-se cerca de 1200-1300ng.

Vector	Fragmento(cDNA)	Enzimas de Restrição
pIC 113	catanina	<i>Sac I</i> Sítio de restrição - GAGCT/C
		<i>Bam HI</i> Sítio de restrição - G/GATCC
V11	catanina+GFP	<i>Not I</i> Sítio de restrição - GC/GGCCGC
		<i>Pac I</i> Sítio de restrição - TTAAT/TAA

Tabela 2 Tabela com as enzimas de restrição utilizadas em cada clonagem, locais de restrição verificados em: <https://www.neb.com/tools-and-resources/selection-charts/frequencies-of-restriction-sites>

2.12 DESFOSFORILAÇÃO

A desfosforilação dos vetores hidrolisados implica a remoção dos grupos fosfato das extremidades do DNA pela fosfatase alcalina. A remoção do grupo fosfato impede a formação de uma ligação fosfodiéster, impedindo a recircularização do vetor de clonagem (caso o plasmídeo seja hidrolisado somente com uma das enzimas utilizadas na clonagem), reduzindo significativamente os falsos positivos (células que recebem o vetor sem fragmento).

A reação foi realizada num volume final de 35µl, adicionou-se 30µl da hidrólise do vetor, 3,5µl de tampão da fosfatase (que está 10X concentrado) e 1 µl de enzima Antarctic Phosphatase (New England Biolabs), esta mistura foi incubada durante 60 minutos a 37°C.

Posteriormente faz-se a inativação da enzima por 20 minutos a 65°C.

2.13 MISTURA DE LIGAÇÃO

Na mistura de ligação dos fragmentos de cDNA da catanina ao plasmídeo pGEM-T-Easy, recorreu-se à adição de nucleótidos de adenina nas extremidades 3' do cDNA amplificado por PCR, este processo denomina-se de “A-tailing” e foi necessário devido ao facto de se ter utilizado uma enzima que faz revisão de provas.

Depois o cDNA da catanina foi ligado ao vetor pIC113 com o objetivo de se ligar ao cDNA da GFP. A fusão do cDNA da catanina com a GFP foi posteriormente clonada no vetor V11 com domínio dd (desestabilizador), que leva à degradação da proteína catanina assim que esta é produzida pela célula.

As quantidades de vetor e fragmento utilizadas nas misturas de ligação foram calculadas a partir da seguinte fórmula empírica:

$$V/pbV = I/pbI$$

V = quantidade de vetor

pbV = nº de pares de bases do vetor

I = quantidade de fragmento

pbI = nº de pares de bases do fragmento

A partir de 40 ng de vetor calculou-se a quantidade de fragmento a utilizar em cada mistura de ligação. Após esse cálculo adicionou-se 10 vezes mais fragmento do que o valor calculado. A proporção de vetor/fragmento utilizada foi aproximadamente de 1:10.

Todas as misturas de ligação realizaram-se num volume final de 10 µl e utilizou-se 0,5 µl da enzima T4 DNA ligase (New England BioLabs – 400 U/ml).

As reações de ligação decorreram durante a noite à temperatura de 16°C.

2.14 TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS COMPETENTES

Após a ligação do fragmento de interesse ao vetor de clonagem transformou-se a estirpe bacteriana de *E.coli* denominada de DH5α. Adicionou-se 5µl das respetivas reações de ligação a 50µl das células competentes DH5α.

Para a transformação das células competentes procedeu-se do seguinte modo: a mistura de ligação foi adicionada às células competentes que foram incubadas

durante 20 minutos em gelo. Em seguida efetuou-se um choque térmico a 42°C durante 90 segundos, realizando-se a segunda incubação em gelo durante 2 minutos.

Às células transformadas adicionou-se 600µl de meio de cultura LB (Luria Bertani) e incubou-se com agitação constante a 180xg durante cerca de 30 minutos, a 37°C. Para que o gene que confere resistência ao antibiótico pudesse ser expresso.

Em seguida centrifugou-se a 7000xg durante 1 minuto e descartou-se o sobrenadante, o sedimento foi ressuspensionado em 100µl de LB e inoculado em LB agar com o antibiótico correspondente ao gene de resistência presente na plasmídeo incorporado nas células transformadas. Após inocular o meio de LB agar, as placas são colocadas na estufa a 37°C durante a noite.

2.15 “COLONY PCR”

O “colony PCR”, ou PCR de colónias, é realizado ao mesmo tempo que se realiza o riscado das colónias isoladas a partir da cada transformação e tem por objetivo detetar quais os clones positivos (que inseriram o fragmento em estudo). Com a ponta da pipeta a colónia é picada o mais precisamente possível e no fundo de um tubo de PCR raspa-se essa colónia, com o restante das células que ficam na ponta da pipeta, faz-se o riscado correspondente.

Geralmente faz-se PCR de várias colónias com dois controlos, um positivo e outro negativo. No controlo positivo o DNA deve conter a sequência que vai ser amplificada a partir das colónias e o controlo negativo apenas deve conter a reação de PCR sem DNA.

A reação de “colony PCR” contém os “Primers Forward” e “Reverse”, Dream *Taq* polimerase (Fermentas), Tampão Dream *Taq* a 1X, dNTPs a 2 mM, MgCl₂ 1,5mM e água, perfazendo o volume de 25µl. Os resultados são analisados em gel de agarose a 1%.

Reagentes	Quantidade	Condições do PCR
Tampão 10x	2,5 µl	Desnaturação Inicial- 95°C-3min Desnaturação- 95°C-30seg } 35 Ciclos Annealing- 55°C- 30 seg Extensão – 72°C-2 min Extensão Final – 72°C-15min
dNTP's 2 mM	2,5 µl	
Primer Forward 30 pmol/µl	1 µl	
Primer Reverse 30 pmol/µl	1 µl	
Dream Taq Polimerase	0,2 µl	
Água	17µl	

Tabela 3 Condições do “Colony PCR” para amplificação da catanina, nos vetores de clonagem pGEM-T-EASY e pIC 113

Reagentes	Quantidade	Condições do PCR
Tampão HF	10 µl	Desnaturação Inicial- 98°C-30 seg Desnaturação- 98°C-30seg } 35 Ciclos Annealing- 65°C- 20 seg Extensão – 72°C-1 min Extensão Final – 72°C-10min
dNTP's 2 mM	5 µl	
Primer Forward 30 pmol/µl	1 µl	
Primer Reverse 30 pmol/µl	1 µl	
Taq Polimerase Phusion	0,5 µl	
Água	32,5µl	

Tabela 4 Condições de “Colony PCR” para amplificação da catanina, no vector V11

2.16 PREPARAÇÃO DE DNA PLASMÍDICO EM PEQUENA ESCALA (MINIPREPS)

Após a detecção das colónias positivas por “colony PCR”, as colónias recombinantes foram crescidas em meio líquido para posterior extração de DNA plasmídico. O DNA plasmídico foi preparado utilizando o QIAprep Spin Miniprep extraction kit (QIAGEN) de acordo com as especificações do fabricante.

2.17 PREPARAÇÃO DE DNA PLASMÍDICO EM GRANDE ESCALA (MAXIPREPS)

A eletroporação do *T. gondii* para inserção do DNA recombinante no genoma implica a utilização de grandes quantidades de DNA, desta forma, para extrair grandes quantidades de DNA plasmídico utilizou-se o QIAGEN Plasmid Maxi Kit (QIAGEN), de acordo com as especificações do fabricante.

2.18 SEQUENCIAÇÃO

A sequenciação das amostras de DNA obtidas, é realizada em três passos: a reação de sequenciação (no aparelho de PCR), a precipitação dos fragmentos de DNA e a eletroforese. Através deste procedimento, podemos ter a informação de que as clonagens realizadas não apresentam erros, mutações, e que foram inseridas na grelha correta de leitura.

Para a realização das reações de sequenciação utilizou-se o BIG Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Nestas reações utiliza-se apenas um “primer” por reação e a solução de dNTP’s é completada com os nucleótidos terminadores marcados com fluorescência (ddNTP’s), que terminam a reação após a sua incorporação.

Reagentes	Quantidade	Condições do PCR
BigDye Sequencing Buffer a 1x	2 µl	Desnaturação Inicial- 96°C-1min Desnaturação- 96°C-1seg Annealing- 50°C- 5 seg Extensão – 60°C-4 min Hold – 12°C-10min
Reaction Premix a 1x	2 µl	
DNA	2 µl	
Água	3 µl	
Primers	1 µl	
		35 Ciclos

Tabela 5 Condições de PCR e reagentes utilizados.

Primers	Sequência Nucleotídica
catanina F interno	5'ATAACGTGCGGAGTTATTGAC3'
catanina R interno	5'GTTTGCTCCTCGCCGAAC3'
catanina pIC 113 F	5'CCCGAGCTCCAAGAGAAAGGTG CACCATG3'
catanina pIC 113 R	5'CGCGGATCCTCATCGACTGCC GAACTC3'
catanina V11 F	5'GAATGCGGCCGCGTGAGCAAG GGCGAGGAG3'
catanina V11 R	5'CCCTTAATTAATCATCGACT GCCGAACTCG3'

Tabela 6 Primers utilizados nas reações de sequenciação

Após a reação de sequenciação no aparelho de PCR, adiciona-se 10µl de água, 1/10 do volume final de acetato de sódio a 3M e 2,5 volumes de etanol a 95% (para precipitar a reação). A mistura é incubada à temperatura ambiente durante 30 minutos e centrifugada 30 minutos a 13000xg a uma temperatura de cerca de 4°C. O sobrenadante resultante da centrifugação foi pipetado do lado oposto ao precipitado e o precipitado foi lavado com 50µl de etanol a 70% e centrifugado a 13000xg à temperatura de cerca de 10°C durante 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado colocado à temperatura ambiente, até que o etanol evapora-se por completo. Após a precipitação a reação foi entregue no serviço de sequenciação do Instituto Gulbenkian de Ciência.

2.19 CONDIÇÕES E MEIOS DE CULTURA PARA BACTÉRIAS

As células de *E. coli* foram propagadas em meio líquido com agitação ou em meio sólido, à temperatura de 37 °C. Estas células podem ser mantidas em meio sólido durante alguns dias, mas a sua conservação por longos períodos de tempo foi feita em meio líquido contendo 15% (v/v) de glicerol, a -70°C.

O meio de cultura líquido utilizado foi o LB, por vezes suplementado com ampicilina (100µg/ml) ou canamicina (1µg/ml) para a seleção/amplificação de plasmídeos que confirmam resistência a este antibiótico. Como meio sólido, acrescentou-se ao meio LB 1,5% (m/v) de agar (LA). O meio LB é composto por, bactopectona 10 g/l; extracto de levedura 5 g/l; NaCl 5 g/l.

2.20 *Toxoplasma gondii*

T. gondii é um parasita intracelular obrigatório. Desta forma, quer a manutenção das culturas, quer as experiências desenvolvidas tiveram que ser realizadas em cultura de células.

Taquizoitos de *T. gondii* foram inoculados em células HFF, células de prepúcio humano (ATCC n.º SCRC-1041) previamente confluentes. No caso dos parasitas transformados, para além do soro fetal bovino (10%), foi adicionado ao meio de cultura DMEM as respetivas drogas de seleção a uma concentração de 1:500 de xantina e a MPA (ácido micofenólico) a uma concentração de 1:500, que vão impedir que os parasitas que não incorporam o DNA exógeno sobrevivam.

Os *T. gondii* invadem as células e são monitorizados com recurso ao microscópio ótico invertido. Se os parasitas e as células estiverem nas suas condições ótimas, os parasitas em três dias conseguem lisar um tapete de células HFF confluyente, nesta situação, os parasitas devem ser passados para outro recipiente com células confluentes, caso contrário corre-se o risco de perder os *T.gondii* pois estes não sobrevivem muito tempo fora das células.

2.21 CULTURA DE CÉLULAS DE MAMÍFERO

Neste estudo foram utilizadas células HFF para cultivo e estudos de invasão em *T. gondii*. Estas células são fibroblastos derivados de prepúcio humano ATCC n.º SCRC-1041, conservadas em nitrogénio líquido (a longo prazo). As células HFF são cultivadas em atmosfera húmida com 5% de CO₂ a 37°C. Foram mantidas em crescimento exponencial, monocamadas subconfluentes e confluentes (aquando da invasão por *T.gondii*) em meio de cultura DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium") com glutamax e suplementado com 10% de soro fetal bovino. Os reagentes foram todos adquiridos à Invitrogen.

O armazenamento destas células a longo prazo é feito em azoto líquido, o seu meio de congelação é DMEM suplementado com 20% de soro fetal bovino e 10% de DMSO (criopreservante). Para serem congeladas as células são colocadas num contentor apropriado que baixa a temperatura gradualmente (1°C por minuto). As células são colocadas nesse contentor a -80°C durante a noite e no dia seguinte transferidas para o azoto líquido. Para serem utilizadas, o seu descongelamento é realizado o mais rapidamente possível para que o criopreservante (DMSO), que é citotóxico, seja diluído em meio de cultura o mais rapidamente possível.

As células HFF foram mantidas em subconfluência, antes de atingirem a confluência as células foram tratadas com Tripsina (Invitrogen), para serem destacadas da placa de cultura (placa de petri). Geralmente este procedimento ocorre até cerca de 30 passagens, inoculando-se o meio de cultura com células novas. Ao fim dessas passagens descongela-se células novas provenientes do "stock" de azoto líquido.

2.22 CULTIVO DE *T. gondii* EM CÉLULAS HFF

As células HFF são utilizadas para invasão pelos parasitas quando estas se encontram confluentes, ou seja, quando cobrem toda a área da placa onde foram cultivadas.

Antes de realizar as experiências os parasitas devem ser contados na câmara de Neubauer diluindo-se em azul de tripano na proporção de 1:10.

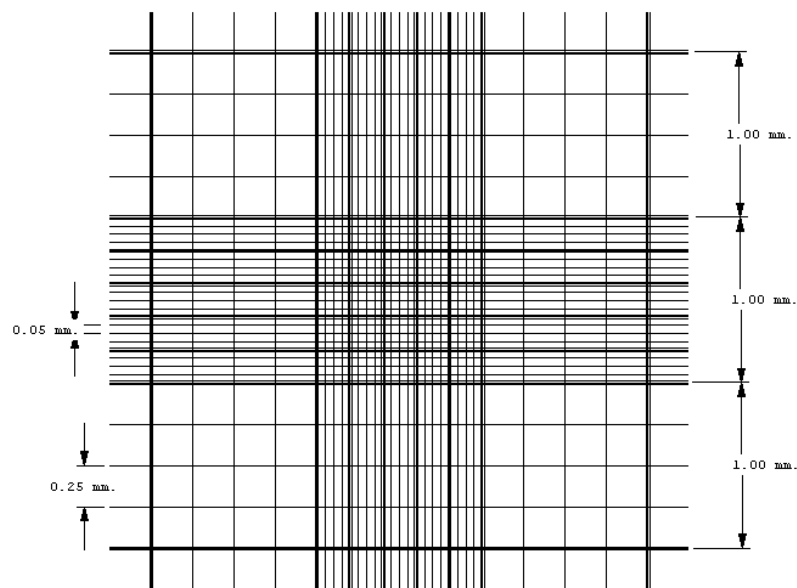


Ilustração 8 Câmara de Neubauer

2.23 ELETROPORAÇÃO DE *T. gondii*

A técnica de eletroporação baseia-se na introdução de DNA exógeno através de uma descarga elétrica. Como queremos que o DNA inserido, seja inserido no genoma este deve ser eletroporado previamente linearizado para permitir que ocorra integração ao acaso. Desta forma, o DNA foi linearizado por hidrólise com a enzima de restrição PacI.

Durante a eletroporação o DNA exógeno vai “entrar” nas células após um choque elétrico que vai polarizar as regiões hidrofílicas dos fosfolípidos presentes nas membranas celulares, causando uma abertura nos poros celulares, permitindo a entrada da molécula de DNA exógeno. O protocolo utilizado foi o “Basic Parasite Nucleofactor kit 2” (Lonza).

Como já referido a construção de DNA foi previamente linearizado com a enzima apropriada numa proporção de 10µg/reação, incubado durante a noite. O passo seguinte foi precipitar o DNA, adicionando 1/10 do volume inicial de acetato de sódio a 3M e 2,5 do volume com etanol absoluto (a -20°C), em seguida centrifugou-se durante 30 minutos a 1300xg a 4°C. Lavou-se com 1 ml de etanol a 75% (a - 20°C) e centrifugou-se a 1300xg durante 15 minutos à temperatura de 4°C.

Após repetir o passo anterior, secou-se o DNA na câmara de fluxo laminar e depois de seco ressuspendeu-se em 5µl de água estéril. Incubou-se a 60°C durante 10 minutos e deixou-se arrefecer (para facilitar a solubilização). Quando arrefecido adicionaram-se 100µl da solução “Nucleofector” ressuspendendo-se bem o DNA. Por fim adicionou-se 10U da enzima de restrição utilizada para linearizar o plasmídeo (a presença da enzima favorece o sucesso da integração do DNA no genoma).

O passo anterior trata-se da preparação do DNA para ser eletroporado, na eletroporação propriamente dita, utiliza-se todos os parasitas provenientes da lise de um T25 (525µl) e implica a preparação dos parasitas que são centrifugados a 800xg durante 10 minutos a 4°C (para remover o meio de cultura). Após descartar o sobrenadante, lavou-se o precipitado de parasitas com 1volume de PBS estéril (determinado pelo protocolo do fabricante) e centrifugou-se novamente (com as mesmas condições da centrifugação anterior). O sobrenadante é novamente descartado e os parasitas presentes no precipitado são ressuspensos em 100µl da solução “Nucleofector”/DNA com a enzima utilizada a 10U. Os *T.gondii* com o DNA são adicionados a uma cuvette do “kit 2” cobrindo o fundo da cuvette sem bolhas de ar, selecionando o programa U-33 no equipamento insere-se a cuvette no aparelho e deixa-se o programa decorrer. Após retirar a cuvette do equipamento adiciona-se 500µl de meio DMEM (descrito no ponto 2.21) gentilmente. Os parasitas eletroporados são transferidos para frascos T25 (525µl) com células HFF confluentes e para placas com poços com lamelas (5µl, 20µl e 25µl). As células HFF antes de receberem os novos parasitas são tratadas, mudando o seu meio e adicionando a este gentamicina a uma concentração de 25mg/ml.

2.24 SELEÇÃO DOS TRANGÉNICOS

Os transgênicos foram selecionados com recurso às drogas xantina e a MPA (ácido micofenólico). Os *T.gondii* transgênicos têm presente no seu DNA um gene denominado de HXGPRT de hipoxantina-xantina-guanina-fosforibosiltransferase. Este gene permite selecionar os taquizóitos que não incorporaram os DNA recombinante, pois os parasitas sem este gene morrem na presença de xantina e do MPA (Donald, et al., 1996). No entanto este processo não é imediato, os parasitas são mantidos através de sucessivas lavagens com PBS e mudanças de meio DMEM

(como descrito no ponto 2.21), que permite através das lavagens remover metabolitos produzidos pelos parasitas e parasitas mortos. Os *T.gondii* que incorporaram o DNA clonado mantêm-se “saudáveis”.

2.25 SELEÇÃO CLONAL

A seleção clonal dos parasitas, tem por objetivo selecionar um clone, ou seja, obter uma população a partir de um único parasita que incorporou o DNA de interesse. Para isso são utilizadas placas de 96 poços com células HFF confluentes. De seguida são feitas inoculações de diluições sucessivas de parasitas. As placas de 96 poços são monitorizadas, com recurso do microscópio ótico invertido, e os poços com uma colónia isolada devem ser selecionados e mantidos, sendo mudado o seu meio de cultura sempre que necessário.

2.26 MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

As células que foram processadas para microscopia de fluorescência foram previamente semeadas sobre lamelas de vidro (VWR). Estas células foram lavadas com PBS (Invitrogen) duas vezes e foram fixadas com metanol durante 10 minutos a -20°C. Seguidamente as células foram lavadas 2 vezes com PBS e uma vez com 0,1% (v/v) de Tween em PBS. Depois as células foram bloqueadas em 3% (m/v) de BSA (Calbiochem) em PBS durante 15 minutos à temperatura ambiente. Em seguida as células foram incubadas com o anticorpo primário anti-tubulina-glutamilada (Adipogene) ou anti-tubulina-acetilada (Sigma) (1:200, na solução do bloqueio) durante 1 hora à temperatura ambiente.

As amostras foram posteriormente lavadas 2 vezes em PBS e uma vez em 0,1% (v/v) de Tween em PBS. O anticorpo secundário, anti-ratinho-594 (Molecular Probes) (1:500, na solução de bloqueio) foi incubado durante 1 hora à temperatura ambiente. As preparações foram lavadas 2 vezes em PBS. As preparações foram montadas em meio de montagem DAPI Fluorocount G (SouthernBiotech).

As células foram examinadas num microscópio de fluorescência (Leica DMRA2) e a aquisição das imagens foi feita com uma câmara “cooled CCD” e com o “software” de imagem MetaMorph (“Universal Imaging Corporation”). O processamento de imagens foi feito com o “software” ImageJ.

3 RESULTADOS

3.1 CLONAGEM MOLECULAR

3.1.1 SUB-CLONAGEM DA CATANINA DE *Toxoplasma gondii* EM pGEM-T-EASY

Realizou-se a sub-clonagem do cDNA da catanina no vetor de clonagem pGEM-T-EASY. Este vetor está linearizado e apresenta nas suas extremidades um nucleótido de timina desemparelhado o que permite a ligação de um produto de PCR que tenha na sua extremidade um nucleótido de adenina desemparelhado.

Numa primeira fase, procedeu-se à ligação do fragmento de cDNA da catanina (amplificado por PCR) ao vetor de clonagem pGEM-T-EASY. Para isso foi necessário adicionar às extremidades 3' do cDNA da catanina nucleótidos de adenina, permitindo desta forma a ligação a este vetor.

Após a clonagem transformaram-se células *E.coli* DH5 α e inoculou-se em meio seletivo LB agar suplementado com antibiótico ampicilina. No dia seguinte foi feito um riscado das colónias transformantes isoladas e foi feito um “colony PCR” para testar quais dos transformantes eram realmente recombinantes. A ilustração 9 mostra o resultado da eletroforese do “colony PCR” onde se pode observar que todas as colónias testadas eram recombinantes. Duas colónias recombinante foram selecionadas e inoculadas em meio de cultura para a extração do respetivo DNA plasmídico (minipreps).

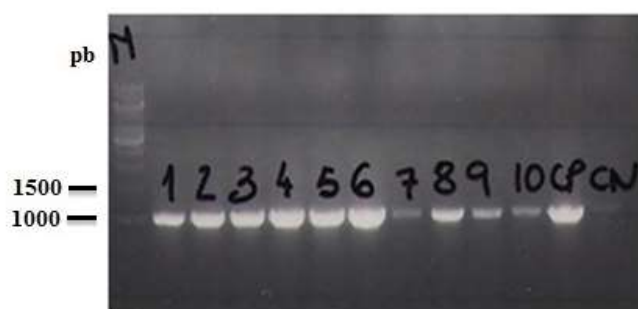


Ilustração 9 Resultado da eletroforese em gel de agarose a 1% do "colony PCR" correspondente sub-clonagem do cDNA da catanina de *T.gondii* no vetor de clonagem pGEM-T-EASY; M- Marcador de massa molecular; 1-10 colónias selecionadas para ensaio de "colony PCR"; CP- controlo positivo; CN- controlo negativo.

3.1.2 HIDRÓLISE DO VETOR pGEM-T-EASY COM O cDNA DA CATANINA CLONADO

Após extração do DNA plasmídico, hidrolisou-se o vetor recombinante com as enzimas *SacI* e *BamHF*, por forma a excisar a região codificante da catanina para posterior clonagem no vetor pIC113. Estas enzimas de restrição formam extremidades 5'coesivas, que serão compatíveis com as do vector pIC 113 que foi previamente hidrolisado com as mesmas enzimas.

Na ilustração 10, observa-se o resultado da eletroforese proveniente da hidrólise do plasmídeo pGEM-T-easy com a catanina clonada. Nesta imagem é possível ver a região de onde foi excisada do gel a banda de 1220pb, que correspondia à região codificante da catanina e uma banda de 3015pb que corresponde ao vetor. O DNA extraído da banda foi purificado e utilizado para a ligação no vetor pIC113.

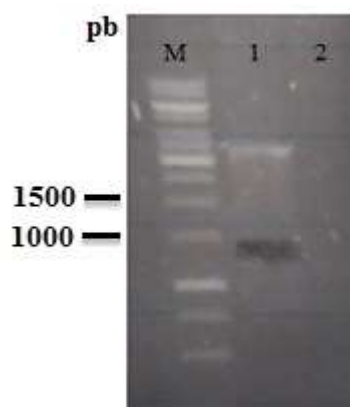


Ilustração 10 Eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos da hidrólise do vetor recombinante pGEM-T-EASY; M-marcador de massa molecular; 1-2 produtos de hidrólise das colónias selecionadas (4 e 6) por “colony PCR”.

3.1.3 SUB-CLONAGEM DA CATANINA DE *Toxoplasma gondii* NO VECTOR pIC 113

Após clonar a região codificante da catanina no pGEM-T-EASY, a sub-clonagem da catanina de *T.gondii* no vetor pIC 113 teve como objetivo a fusão das regiões codificantes da catanina com a da proteína GFP (na região N-terminal da catanina). A proteína GFP emite luz verde fluorescente, quando é visualizada no microscópio de fluorescência, permitindo a visualização desta proteína dentro da célula. Desta forma, podemos monitorizar se a proteína está a ser expressa e qual a localização intracelular da proteína. Outra alternativa para a deteção da síntese e da localização da proteína seria a utilização de um anticorpo anti-catanina, no entanto ainda não foi produzido um anticorpo específico contra a catanina de *T. gondii*. Após a extração do DNA hidrolisado do gel de agarose (ilustração 10), foi feita uma reação de ligação entre este fragmento de DNA extraído e o vetor pIC113 previamente hidrolisado (com as mesmas enzimas). Células competentes de *E.coli* DH5 α foram transformadas com a respetiva mistura de ligação e cultivadas em meio seletivo LB agar com Canamicina. De seguida, testaram-se algumas colónias por “colony PCR” a fim de verificar se eram recombinantes.

Os “primers” utilizados no “colony PCR” amplificam a região codificante da catanina e originando um produto de 1220pb caso o plasmídeo seja recombinante. Todas as colónias testadas eram recombinantes e foram escolhidas 2 colónias para lançar culturas líquidas para posterior extração de DNA plasmídico. Na ilustração 11 pode-se observar o resultado da eletroforese do “colony PCR”.



Ilustração 11 Eletroforese em gel de agarose a 1% da sub-clonagem da região codificante da catanina de *T.gondii* no vetor de clonagem pIC 113; M-Marcador de massa molecular; 1-10 colónias selecionadas para “Colony PCR”; CP-controlo positivo; CN-controlo negativo;

A fim de verificar se os clones recombinantes correspondiam à clonagem esperada, extraiu-se DNA plasmídico a partir de culturas líquidas de duas colônias positivas no “colony PCR” e fez-se uma hidrólise utilizando as enzimas de restrição *NheI* e *BglII*. A enzima *NheI* hidrolisa na região codificante da GFP e a *BglII* na região codificante da catanina, se a clonagem estiver correta espera-se observar um produto de 1761pb. A ilustração 12 mostra a eletroforese onde foram analisados os resultados das hidrólises e onde podemos observar claramente o aparecimento de uma banda de DNA com o tamanho esperado.

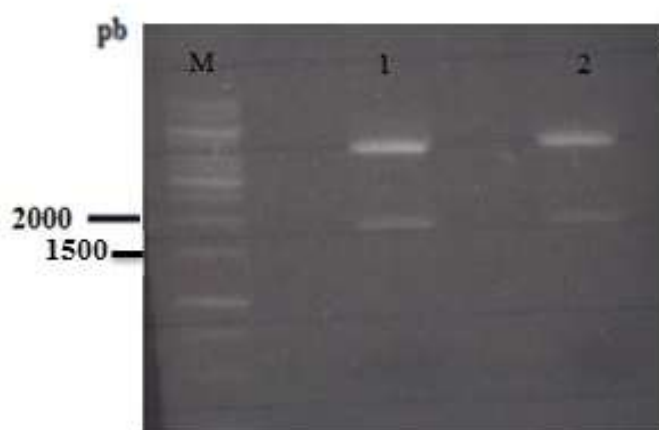


Ilustração 12 Electroforese em gel de agarose a 1% referente à hidrólise do vetor pIC 113 com a região da catanina clonada; M- marcador de massa molecular; 1-2 produto de hidrólise das colônias selecionadas (9 e 10) pelo “colony PCR” com 1761pb (este fragmento contém parte da região codificante da catanina e parte da região codificante da GFP).

3.1.4 SEQUENCIAÇÃO DA CATANINA NO VECTOR pIC 113

Apesar de termos clones recombinantes e de o produto da hidrólise ter o tamanho esperado, é necessário sequenciar a fim de verificar se não ocorreram erros (mutações) aquando da inserção do fragmento no vetor e durante o PCR que amplificou a região codificante da catanina que foi inicialmente clonada no pGEM-T-EASY. O PCR realizado para amplificar o cDNA da catanina e o clonar no vetor pGEM-T-EASY foi realizado com recurso a uma *Taq* polimerase que faz revisão de provas, a *Phusion*, minimizando a probabilidade de ocorrência de erros durante a amplificação. Sequenciou-se a região codificante da catanina após a sua sub-

clonagem no vector pIC113. Esta foi realizada utilizando “primers” que permitam sequenciar toda a região codificante da catanina e os locais de inserção no vetor.

Após a confirmação da ausência de quaisquer mutações, ou seja, da inexistência de qualquer alteração à grelha aberta de leitura, prosseguiu-se com a clonagem da região codificante da catanina em fusão com a GFP no vetor V11 (vetor de utilizado para sobre-expressão em *T. gondii*).

3.1.5 CLONAGEM DA REGIÃO CODIFICANTE DA CATANINA DE *Toxoplasma gondii* EM FUSÃO COM A GFP NO VECTOR V11

Para a clonagem da região codificante da catanina de *T.gondii* em fusão com a GFP no vetor 11 este teve que ser previamente hidrolisado com as enzimas de restrição *NotI* e *PacI*. As enzimas de restrição foram escolhidas especificamente para hidrolisarem para permitir extrair a região codificante da catanina em fusão com a GFP e inserir em grelha com o domínio DD, domínio desestabilizador, presente na vetor V11. A enzima *NotI* hidrolisa na região N-terminal da GFP e a enzima *PacI* hidrolisa na região C-terminal da catanina.

Foi realizado um PCR, a partir de plasmídeo pIC 113 recombinante, para amplificar a região codificante da catanina em fusão com a da GFP, para posterior clonagem no vetor V11. Os produtos amplificados tinham 1979pb, que corresponde à região codificante da catanina mais a região codificante da GFP.

Como demonstrado na ilustração 13 painel A, inicialmente não se obteve amplificação com a *Taq* polimerase *Phusion* (tem atividade de revisão de prova, minimizando os erros ocorridos durante a amplificação). Curiosamente, aumentando a temperatura de “annealing” de 63°C para 65°C, obteve-se um produto de amplificação com o tamanho esperado (1979pb, ver ilustração 13 painel B).

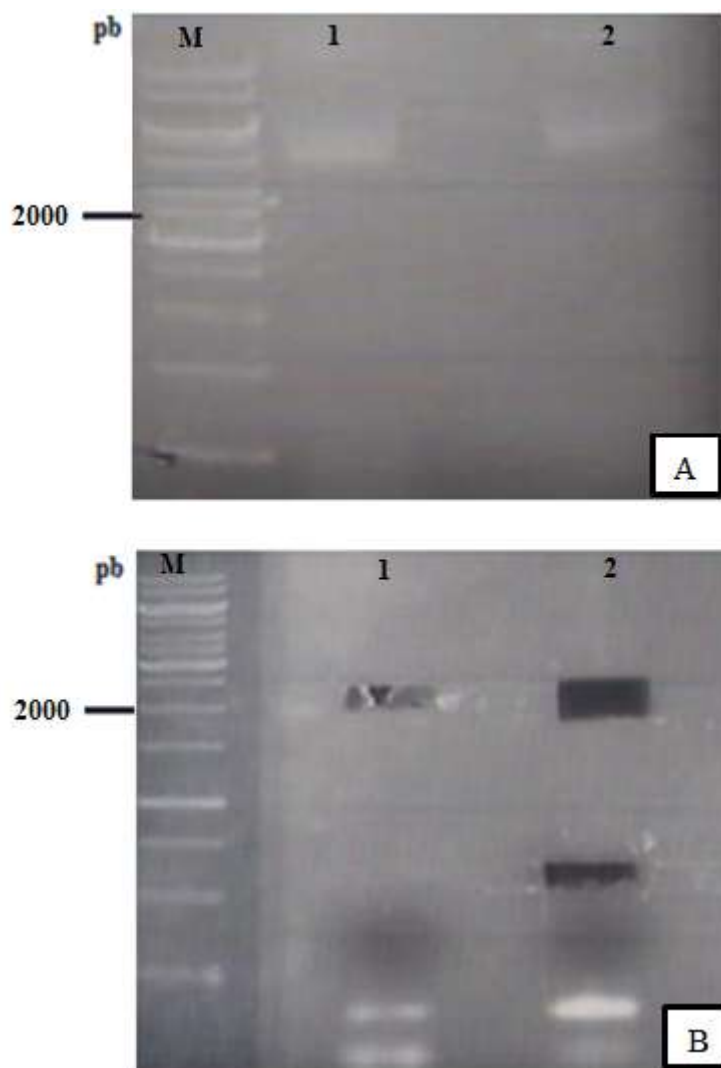


Ilustração 13 Eletroforese em gel de agarose a 1% do PCR da catanina em fusão com a GFP a partir do vetor pIC 113. Fig. A -sem produto de amplificação; Fig. B- locais de extração da banda de DNA com tamanho aproximado de 1979pb.

As bandas de DNA obtidas foram extraídas do gel de agarose e purificadas (ver ilustração 14). No entanto, a quantidade de DNA obtida após a purificação não foi suficiente para proceder à hidrólise (com as enzimas *PacI* e *NotI*) do fragmento de DNA e respetiva ligação no vetor V11.

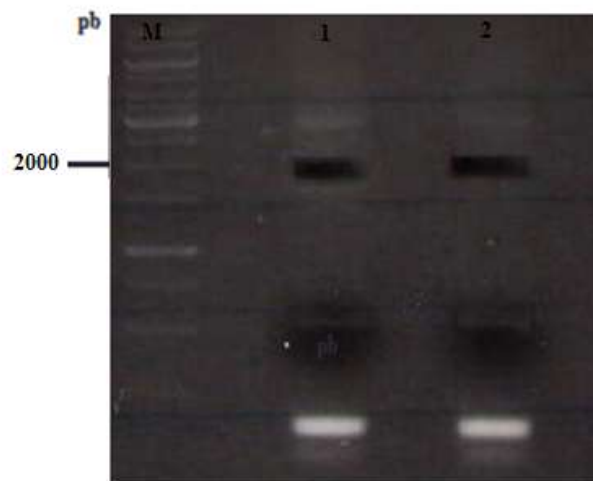


Ilustração 14 Eletroforese em gel de agarose a 1% do PCR da catanina em fusão com a GFP a partir do vetor pIC 113 com locais de extração da banda de DNA com tamanho aproximado de 1979pb.

Como a quantidade de DNA obtida não foi a suficiente para se proceder à reação de hidrólise seguida da reação de ligação realizou-se um novo PCR com um gradiente de temperaturas (40-60,6°C), com o objetivo de descobrir qual a temperatura ideal de “annealing” dos primers. Apenas obteve-se amplificação do produto esperado com a temperatura de 60,6°C.

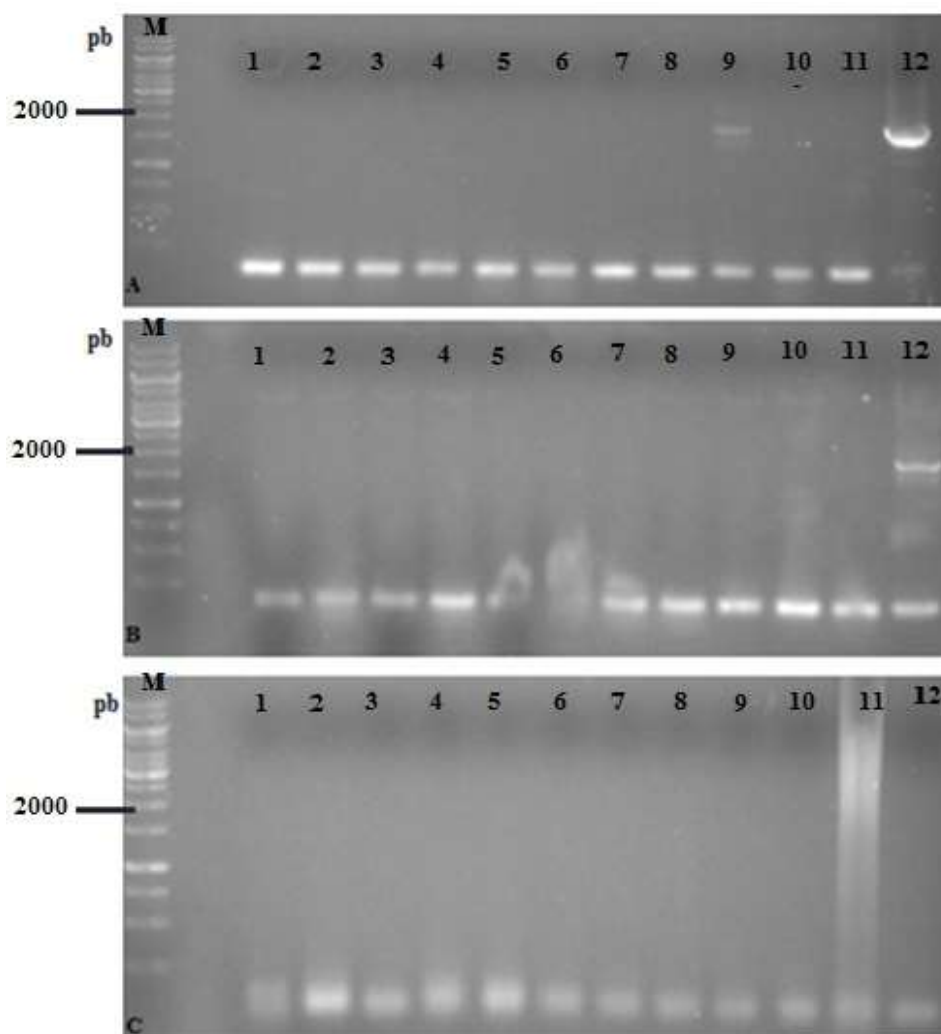


Ilustração 15 Electroforese em gel de agarose a 1% referente ao PCR com gradiente de temperaturas de 40°C a 60,6°C. A-Gradiente de temperaturas referente ao DNA plasmídico extraído da colônia 9; B – Gradiente de temperaturas referente ao DNA plasmídico extraído da colônia 10; C- Controlo negativo do gradiente de temperaturas;

Com o objetivo de reconfirmar que os plasmídeos eram recombinantes fez-se um PCR utilizando “primers” que permitem amplificar uma região dentro da região codificante (“primers internos”) da catanina (ver materiais e métodos ponto 2.18), o produto de amplificação esperado deve ter 1050pb.



Ilustração 16 Análise dos resultados do PCR da catanina no vetor pIC113 por eletroforese em gel de agarose a 1%, utilizando os “primers internos” da catanina.

Apesar das diferentes abordagens os resultados obtidos não foram totalmente satisfatórios, tendo sido a primeira opção a melhor de todas. Desta forma, tentou-se obter quantidade suficiente de DNA para se prosseguir com a clonagem nestas condições específica. Foram feitas duas reações de PCR em paralelo para aumentar a quantidade do produto de amplificação obtido.

O produto amplificado foi hidrolisado com as enzimas *NotI* e *PacI* e utilizado na mistura de ligação com o vetor V11 previamente hidrolisado com as mesmas enzimas. Após a ligação no vetor V11, as células competentes DH5α foram transformadas e inoculadas em meio LB agar com ampicilina. Foram selecionadas algumas colónias para serem testadas por “colony PCR”. Após a análise do “colony PCR” por eletroforese em gel de agarose a 1%, selecionaram-se duas colónias recombinantes. De seguida, extraiu-se DNA plasmídico a partir de culturas líquidas provenientes destas colónias e sequenciou-se o fragmento clonado. A sequenciação teve por objetivo verificar que não havia erros nas regiões codificantes e que o DNA tinha sido inserido corretamente. Após essa confirmação, preparou-se uma grande cultura de um destes clones, para se extrair DNA plasmídico em larga escala

(maxipreps) com o objetivo de ter DNA plasmídico suficiente para eletroporar *T. gondii*.

3.2 TRANFEÇÃO, POR ELETROPORAÇÃO, DOS *Toxoplasma gondii*

Para que haja integração do DNA transfetado no genoma de *T. gondii* este deve ser previamente linearizado antes da transfeção. Desta forma, hidrolisou-se cerca de 10µg de DNA com a enzima *PacI*.

Em seguida precipitou-se o DNA hidrolisado, dissolveu-se em 5 µl de água estéril e incubou-se 10 minutos a 60°C para ajudar a solubilizar.

Após a precipitação do DNA os parasitas foram processados para eletroporação (ver materiais e métodos no ponto 2.23). Após a eletroporação os *T. gondii* transfetados foram inoculados em células HFF. O meio de seleção só foi adicionado 24h após a transfeção, para que o gene responsável pela seleção pudesse ser expresso.

Para testar se a proteína de fusão estava a ser expressa (catanina-GFP), uma vez que esta proteína também contém um domínio de desestabilização (dd), foi necessário adicionar ao meio de cultura o “shield” para permitir que a proteína não seja degradada. Desta forma, inoculámos *T. gondii* em lamelas onde foram previamente crescidas células HFF. Adicionámos o “shield” e após 4 horas as células foram processadas para imunofluorescência indireta (ver materiais e métodos no ponto 4.25). Para se visualizar os parasitas e os microtúbulos glutamilados utilizou-se um anticorpo anti-tubulina-glutamilada, que foi detetado utilizando um anticorpo secundário que emite no vermelho, uma vez que a proteína de fusão emite no verde. O DNA foi corado com DAPI.

Na ilustração 17 pode-se ver os parasitas verdes (devido à presença da proteína de fusão GFP), a tubulina glutamilada a vermelho e o DNA a azul. Desta forma podemos concluir que a proteína de fusão está a ser expressa e que está a responder à presença do “shield”. Podemos ainda observar que a tubulina glutamilada parece não diminuir nas células que sobre-expressam a catanina, indicando que em *T. gondii* esta proteína poderá não afetar preferencialmente os microtúbulos com esta modificação.

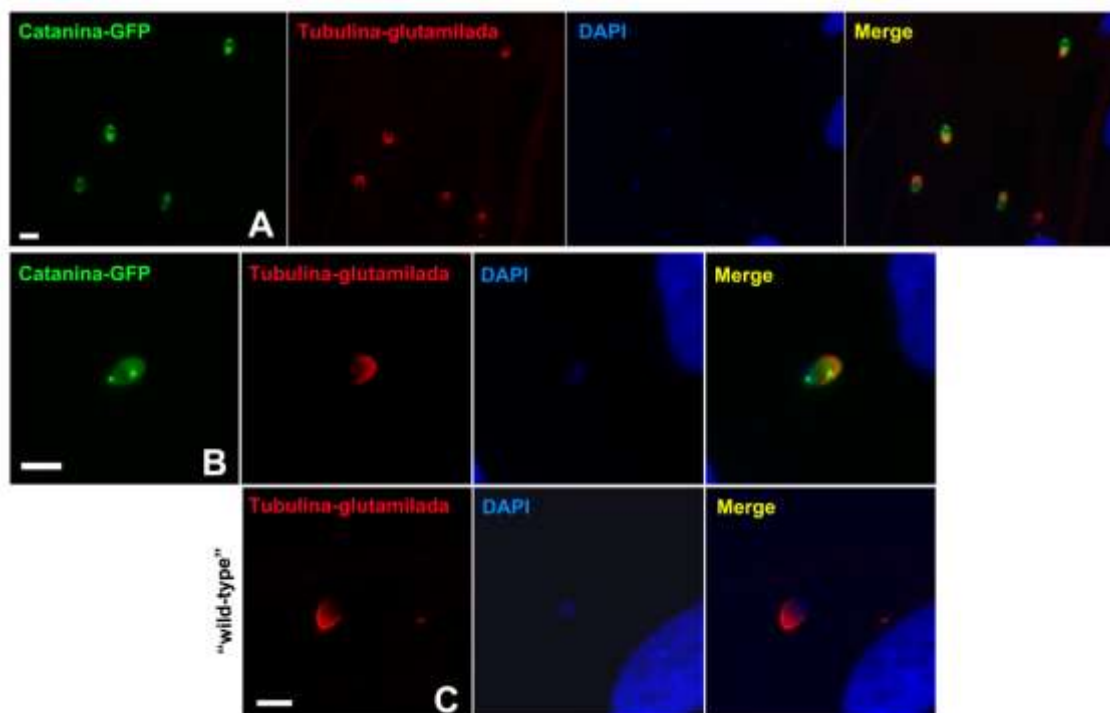


Ilustração 17 Imunofluorescência indirecta dos transgénicos de *T.gondii* (sobre-expressão da catanina-GFP) 30 minutos após invasão, na presença de “shield”, os transgénicos de sobre-expressão e os controlo (*T.gondii* “wild-type”) Fig. A e B – expressão da catanina em fusão com a GFP (verde) a tubulina glutamilada (vermelho), o DNA (azul) e a sobreposição das imagens (merge); Fig.B-Observa-se que por vezes a proteína de fusão surge mais localizada em pequenos pontos que poderão corresponder aos centrossomas (verde), o núcleo (azul), tubulina glutamilada (vermelho); Fig.C – Paineil controlo, onde podemos observar a marcação da tubulina glutamilada no controlo (vermelho) e núcleo (azul).S. Barra de escala = 5µm.

4 DISCUSSÃO

A estratégia para estudar o papel da catanina na regulação do citoesqueleto de MTs durante o processo de invasão por *T.gondii* foi realizada através da sobre-expressão da catanina (subunidade p60) em *T.gondii*. Para isto foi necessário clonar inicialmente o cDNA da catanina (p60) num vetor de expressão de *T. gondii* que foi posteriormente inserido em *T. gondii* por eletroporação. Após seleção dos transgênicos em sobre-expressão da catanina, procedeu-se à respetiva caracterização do fenótipo.

Para a clonagem do cDNA da catanina utilizou-se três plasmídeos diferentes com três funções distintas. Primeiro fez-se a sub-clonagem no vetor pGEM-T-EASY com o objetivo de clonar o cDNA da catanina previamente amplificado por PCR utilizando a técnica de “A-tailing”, em que se adicionou nucleótidos de adenina nas extremidades 3’ do cDNA. Os nucleótidos de adenina emparelham com os de timina existentes no vetor e através da ligase obtém-se um vetor recombinante com o nosso produto de PCR clonado. A sub-clonagem neste vetor apresenta essencialmente duas grandes vantagens: poder amplificar em larga escala a sequência clonada e poder remover o fragmento inserido por hidrólise com enzimas de restrição, garantindo assim que ao sair o fragmento as duas extremidades estão corretamente hidrolisadas. Um dos problemas da hidrólise direta de produtos de PCR é ter a garantia que ambas as extremidades estão corretamente hidrolisadas, sendo que é sempre mais difícil para uma enzima de restrição uma hidrólise na extremidade de um fragmento do que no meio dele. Nesta primeira clonagem do cDNA da catanina não foi necessária a sequenciação pois utilizou-se uma enzima *Taq* polimerase que faz revisão de prova, a *Phusion*. A *Taq Phusion* tem incorporada uma nova enzima *Pyrococcus* com um domínio que aumenta a processabilidade da reação de PCR. A enzima *Phusion* gera novos DNAs com grande precisão e velocidade. Esta enzima tem uma taxa de erro 50 vezes menor do que outras *Taq* e para além de ser termoestável, permite realizar PCR com ciclos mais curtos, rendimentos abundantes e um forte desempenho mesmo na presença de inibidores de PCR. Para além destas vantagens também produz rendimentos mais elevados com menores quantidades de DNA. A polimerase *Phusion* permite ainda a amplificação de DNA genómico até 7.5kb. De seguida procedeu-se a uma segunda sub-clonagem, que teve por objetivo a fusão do cDNA

da catanina com uma proteína verde fluorescente, a GFP. A proteína GFP emite fluorescência verde, e estando ligada à catanina revela-se um bom marcador da proteína em estudo *in vivo*. Esta clonagem foi realizada no vetor pIC 113. Após sequenciação confirmou-se que a grelha aberta de leitura do DNA da catanina e da proteína GFP estavam “in frame” e que não existiam erros que alterassem a sequência de nucleótidos e eventualmente a sua função. Os “primers” utilizados na sequenciação permitiram sequenciar não a sequência do cDNA da catanina e da GFP mas também os respectivos locais de inserção no vetor.

A última clonagem foi realizada no vetor V11, vetor de *T. gondii*, para posterior produção da proteína recombinante dentro do parasita. A clonagem neste vetor foi feita de forma a adicionar um domínio desestabilizador dd (que permite regular os níveis de proteína recombinante produzida) em fusão com cDNA da catanina-GFP. Esta clonagem apresentou alguns problemas técnicos, nomeadamente foi necessário fazer um PCR específico, com gradientes de temperatura, para escolher qual a melhor condição de amplificação do cDNA da catanina-GFP a partir do vetor pIC113. O produto da amplificação foi posteriormente clonado na mesma grelha do domínio dd (presente no vetor V11).

O domínio dd será responsável pela degradação da proteína catanina-GFP no *T. gondii*. Este sistema permite controlar os níveis de proteína dentro da célula através da adição de um “shield” que se liga ao domínio dd e estabiliza a proteína, permitindo a sua acumulação dentro da célula. A regulação pelo domínio dd permite ainda a regulação da proteína, sendo por isso vantajoso no caso da sobre-expressão se revelar tóxica. Após a obtenção do DNA recombinante, este foi linearizado com enzimas de restrição, para permitir a sua posterior integração no genoma das células. De seguida realizou-se a transfeção por electroporação de modo a permitir a passagem dos plasmídeos recombinantes para os *T.gondii* através da sua membrana celular. Utilizando-se as drogas de seleção, MPA e a xantina, foi possível seleccionar os parasitas que continham o nosso DNA de interesse integrado no genoma. A seleção com as estas drogas só foi possível porque a construção que foi integrada no genoma do *T.gondii* possui um gene HXGPRT.

Após a seleção dos transgênicos verificou-se, por microscopia de fluorescência indireta, se a proteína de fusão estava a ser expressa. Para esse fim foi necessário adicionar “shield” ao meio de cultura para que a proteína fosse estabilizada e pudesse ser detetada dentro das células. Este resultado indica que em princípio a nossa proteína de fusão (catanina-GFP) está a ser expressa, todavia haveria que preparar extratos proteicos a partir deste parasitas que estão a produzir a proteína de fusão, realizar uma electroforese SDS-PAGE e um western-blot com anticorpo anti-GFP para confirmar que a proteína de fusão tem o tamanho esperado. Mesmo assim, numa ausência de fenótipo, teremos sempre que considerar se a catanina não tem a sua função comprometida após fusão com a GFP.

Na imunofluorescência utilizou-se anticorpos anti-tubulina glutamilada para marcar os MTs glutamilados, o DAPI para marcar o núcleo e como a GFP estava acoplada à catanina esta pode ser detetada. Em relação à marcação da tubulina glutamilada, observou-se a presença de microtúbulos glutamilados, principalmente na região do conoide, de acordo com o que estava previamente descrito (Plessmann, et al., 2004). Os transgênicos estavam verdes, o que comprovou a eficácia do “shield” utilizado nos ensaios, ou seja, houve estabilização do domínio de dd e consequente acumulação da proteína dentro do parasita verificando-se nos resultados a presença da catanina no *T.gondii* como no citoplasma e possivelmente no centróssoma, á semelhança de estudos realizados em axónios que demonstraram que a catanina está presente no centróssoma (Fridoon, et al., 1999). Este resultado mostra que a proteína recombinante está a ser expressa e que na sua presença os parasitas foram capazes de invadir, uma vez que as células foram fixas 30 minutos após a invasão. A observação de marcação de microtúbulos glutamilados também parece indicar, que em *T. gondii*, a catanina não terá uma ação preferencial sobre estes microtúbulos como o que foi previamente descrito para *Tetrahymena thermophila* (Sharma, et al., 2007). A marcação da catanina-GFP está dispersa pelo citoplasma mas por vezes observa-se uma acumulação, num ponto específico, que poderá ser o centróssoma. Em células de mamífero a catanina está presente nos centróssomas (Buster, et al., 2002), logo, apesar de em *T.gondii* a catanina não parecer ter uma ação preferencial sobre os MTs glutamilados, poderá partilhar a sua função ao nível dos centróssomas. Para se comprovar que a acumulação da catanina está no centróssoma há que fazer uma

imunofluorescência em simultâneo com um anticorpo anti centrina (para marcar os centrossomas) e verificar se há sobreposição de marcação.

O passo a seguir seria uma seleção clonal, por diluição limitante, por forma a isolar um clone transgénico. Após o isolamento de um clone transgénico este seria utilizado para ensaios de placa, com o objetivo de detetar a presença de algum fenótipo. Na formação das placas de lise os parasitas têm que invadir, replicar e sair de dentro da célula para invadir novas células. Diferenças no número de placas ou no tamanho das mesmas, em comparação com a estirpe selvagem, podem indicar que os *T. gondii* transgénicos apresentam algum problema durante estes processos.

5 CONCLUSÃO

Este trabalho contribuiu fortemente para a minha formação ao nível de técnicas de biologia molecular e celular. A clonagem do cDNA da catanina, através de sub-clonagens em diferentes plasmídeos, permitiu adquirir um conhecimento sólido sobre a técnica de PCR, diferentes estratégias de clonagem e sequenciação. Este trabalho também contribuiu para a aprendizagem das técnicas relacionadas com cultivo das células de HFF, células necessárias à manutenção dos parasitas, e dos *T. gondii* propriamente ditos. Apesar de não se ter confirmado o tamanho da proteína de fusão, os transgênicos expressavam a proteína GFP (porque estavam verdes), foram capazes de invadir as células e os MTs glutamilados pareciam intactos. Caso a proteína de fusão esteja funcional, estes resultados parecem indicar uma ausência de função/preferência da catanina sobre os microtúbulos glutamilados. No entanto, observou-se uma acumulação de catanina-GFP que poderá coincidir com o centróssoma. Caso esta localização seja confirmada, seria interessante explorar o papel da catanina no centróssoma do *T. gondii*, isto porque, temos conhecimento de um estudo em células de mamífero que envolve a catanina, e que a sua inibição por duas proteínas dominantes-negativas não afetou a taxa de polimerização e despolimerização da tubulina, em vez disso, impediu a redistribuição da γ -tubulina do centróssoma ao fuso mitótico.

A continuação deste estudo é de extrema importância para a caracterização do papel da proteína catanina em *T. gondii*. Para estudar o seu eventual envolvimento na remodelação do citoesqueleto de microtúbulos durante a invasão. Porém este é um estudo de sobre-expressão que terá que ser obrigatoriamente complementado por um estudo de “perda de função”, por exemplo pela construção de um “knockout”.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amos, L. & Schlieper, D. (2005). "Microtubules and MAPs", *Advances in Protein Chemistry*, 71, pp. 257-298.
- Baquero, M.; Lostritto, K.; Gustavson, M.; Bassi, K.; Appia, F.; Camp, R.; Molinaro, A.; Harris, L. & Rimm, D. (2011). "Evaluation of prognostic and predictive value of microtubule associated protein tau in two independent cohorts", *Breast Cancer Research*, 13.
- Billker, O.; Lourido, S.; Sibley, D. (2009) "Calcium-Dependent Signaling and Kinases in Apicomplexan Parasites". *Cell Press*, 5, pp. 612 – 622.
- Buster D.; McNally K.; McNally, S. (2002). "Katanin inhibition prevents the redistribution of gamma-tubulin at mitosis". *Journal Cell Science*, 115, pp. 1083-1092
- Cooper, G. (2000). *The cell a molecular approach* (2nd ed.), Boston University, Sunderland, EUA.
- Desai, A. & Hyman, A. (1999). "Microtubule cytoskeleton: No longer a also ran". *Current Biology*, 9 (18), pp. 704 – 707.
- Dominguez, R. (2009). "Actin filament nucleation and elongation factors – structure function relationships", *Critical Review in Biochemical Molecular Biology*, 44 (6), pp. 351 – 366.
- Donald, G.; Carter, D.; Ullman, B.; Ross, D. (1996). "Insertional tagging, cloning, and expression of the *Toxoplasma gondii* hypoxanthine-xanthine-guanine phosphoribosyltransferase gene. Use as a selectable marker for stable transformation". *Journal Biological Chemistry*, 24, pp. 14010- 14019.
- Dubey, J.; Lindsay, D.; & Speer, C. (1998). "Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts". *Journal Clinical Microbiology*, 2, pp. 267 – 299.
- Fayer, R. & Frenkel, K. (1979). "Comparative infectivity for calves of oocysts of feline coccidia: *Besnoitia*, *Hammondia*, *Cystoisospora*, *Sarcocystis*, and *Toxoplasma*", *Journal of Parasitology*, 65, pp. 756-7562.
- Fletcher, D., & Mullins, R. (2010). "Cell mechanics and the cytoskeleton", *Nature*, 463 (7280), pp. 485–492.
- Fridoon, A.; Wenqian, Yu.; Francis, McNally. & Peter, B. (1999). "An Essential Role for Katanin in Severing Microtubules in the Neuron". *JCB*, 145, pp. 305 – 315.

- Ghosh, D.; Dasgupta, D. & Guha, A. (2012). "Models, regulations, and function of microtubule severing by katanin", *International Scholarly Research Network*, 2012.
- Hartman, J. & Vale, R. (1999). "Microtubule disassembly by ATP-dependent oligomerization of the AAA enzyme katanin", *Science*, 286, pp. 782 – 785.
- Hu, K.; Johnson, J.; Florens, L.; Fraunholz, M.; Suravajjala, S.; Dilullo, C.; Yates, J.; Roos, D. & Murray, J. (2006). "Cytoskeletal components of an invasion machine – the apical complex of *Toxoplasma gondii*", *Plos Pathogens*, 2, pp. 121 – 138.
- Hu, K.; Roos, D. & Murray, J. (2002). "A novel polymer of tubulin forms the conoid of *Toxoplasma gondii*", *Journal of Cell Biology*, 156, pp. 1039 – 1050.
- Hu, K.; Roos, D. & Murray, J. (2002). "A novel polymer of tubulin forms the conoid of *Toxoplasma gondii*". *JCB*, 156, PP. 1039-1050.
- Kim, S. & Colombe, P. (2007). "Intermediate filament scaffolds fulfill mechanical, organizational, and signaling functions in the cytoplasm". *Genes & Dev.*, 21, pp. 1581 – 1597.
- L. David, S. (2011). "Invasion and intracellular survival by protozoan parasites", *Immunological Reviews*, 240, pp. 72 - 91.
- Liang-Yi, H.; Hua-Ling, C.; Ching-Wen, C.; Bor-Ran, L. & Tang, T. (2004). "Identification of a Novel Microtubule-destabilizing Motif in CPAP That Binds to Tubulin Heterodimers and Inhibits Microtubule Assembly". *Molecular Biology of the Cell*, 15, pp. 2697 – 2706.
- Lodish, H.; Berk, A.; Zipursky, S.; Matsudaira, P.; Baltimore, D. & Darnell, J. (2000). *Molecular Cell Biology* (4th ed.). Freeman, New York, USA.
- Loughlin, R.; Wilbur, J.; McNally, F.; Nédélec, F. & Heald, R. (2011). "Katanin Contributes to Interspecies Spindle Length Scaling in *Xenopus*", *Cell*, 147, pp. 1397 – 1407.
- Machado, F. & Figueiredo, F. (1996). "Revisão: filamentos intermediários". *Medicina, Ribeirão Preto*, 29 104 – 113.
- Mandelkow, E. & Mandelkow, E. (1995). "Microtubules and microtubule associated proteins", *Cell Biology*, 7, pp. 72 – 81.
- Mondragon, R. & Frixione, E. (1996). "Ca²⁺ – dependence of conoid extrusion in *Toxoplasma gondii* tachyzoites", *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 43, pp. 120 – 127.
- Morrisette, J. & Sibley, L. (2002). "Katanin of apicomplexan parasites". *Microbiology Molecular Biology*, 66, pp. 21 – 38.

network in cancer progression”, *Cell & Bioscience*, 3 (7).

Plessman, U.; Reiter-Owona, I. & Lehtreck, F.(2004). “Posttranslational modifications of alfa-tubulin of *Toxoplasma gondii* are encoded by single copy genes containing multiple introns”, *Molecular Biochemical Parasitology*, 29, pp. 261-273.

Reis, Y.; Cortes, H.; Viseu Melo, L.; Fazendeiro, I.; Leitão, A. & Soares, H. (2006). “Microtubule cytoskeleton behavior in the initial steps of host cell invasion by *Besnoitia besnoiti*”, *FEBS Letters*, 580, pp. 4673 – 4682.

Sharma, N.; Bryant, J.; Wloga, D.; Donaldson, R.; Davis, R.; Jerka-Dziadosz, M. & Gaertig, J. (2007). “Katanin regulates dynamics of microtubules and biogenesis of motile cilia”. *Journal of Cell Biology*, 178, pp. 1065 – 1079.

Soldati, D. & Meissner, M. (2004). “Toxoplasma as a novel system for motility”, *Current Opinion in Cell Biology*, 16, pp.32-44.

Standring, S. (2010). *Gray’s Anatomy*. Elsevier Churchill Livingstone, Londres, Inglaterra.

Swedlow, J.; Hu, K.; Andrews, P; Roos, D. & Murray, J. (2001). “A comparison of laser-scanning confocal and wide-field fluorescence microscopy”, *PNAS*, 99 (4), pp. 2014 – 2019.

Tadros, W. & Laarman, J. (1981). “Current concepts on the biology, evolution and taxonomy of tissue cyst-forming eimeriid coccidia”. *Adv.Parasitology*, 20, pp. 294-468.

Verhey, KJ. & Gaertig, J. (2007). “The tubulin code”, *Cell Cycle*, 6, pp. 2152 – 2160.

Yue, J.; Huhn, S. & Shen, Z. (2013). “Complex roles of filamin-A mediated cytoskeleton network in cancer progression”. *Cell Bioscience*, 3, pp.7.